

**Untersuchungen zur Struktur, Wirkungsweise und Biosynthese
der Cervimycine als Verbindungen einer besonderen Klasse
aromatischer Polyketide aus Streptomyceten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Apothekerin Kerstin Herold

geboren am 14. Mai 1974 in Jena

Herrn Prof. Dr. Udo Gräfe† gewidmet.

Gutachter:

1. Doz. Dr. B. Liebermann
2. Prof. Dr. B. Luckas
3. Prof. Dr. A. Zeeck

Tag der Doktorprüfung: 14.12.2004

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.01.2005

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
ACP	Acylcarrierprotein
<i>Asc I</i>	Endonuklease aus <i>Arthrobacter species</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	attenuated total reflection
BAL-31	Endonuklease aus <i>Alteromonas espeijana</i>
<i>BamH I</i>	Endonuklease aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BSA	bovine serum albumin (Rinderalbumin)
c	Konzentration in [g/100ml]
CD	Circulardichroismus
CDCl ₃	Chloroform (deutert)
<i>cer</i>	Cervimycin
Cervi	Cervimycin
CLF	chain length factor (Kettenverlängerungsfaktor)
CoA	Coenzym A
Contigs	identische DNA-Fragmente mit überlappenden Enden
COSY	correlated spectroscopy
cpm	counts per million
<i>d</i>	deutert
D ₂ O	Deuterium
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	distorsionless enhancement by polarisation transfer
DMMS	Dimethylmalonsäure
DMMSDE	Dimethylmalonsäurediester
DMMSE	Dimethylmalonsäureester
DMSO	Dimethylsulfoxid
(r)DNA	(ribosomale) Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Dinukleotidtriphosphat
DoubleINEPT	(Double resonance) intensive nucleus enhancement by polarisation transfer
<i>EcoR I</i>	Endonuklease aus <i>Escherichia coli</i> RY13

<i>EcoR</i> V	Endonuklease aus dem Plasmid J62 pLG74
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIMS	Elektronenstoß-Massenspektrometrie
ESIMS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
Ferm.	Fermentation
GC	Guanin/Cytosin
GET	Glucose/EDTA/TRIS-Puffer
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
<i>Hind</i> III	Endonuklease aus <i>Haemophilus influenzae</i> Rd
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMW	high molecular weight
HOAc	Essigsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HRESIMS	Hochauflösende Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hydr.	Hydrolyse
Hz	Hertz
i.d.	Innendurchmesser
INADEQUATE	incredible natural abundance double quantum transfer experiment
IPTG	Isopropyl - β -D-thiogalactosid
IR	Infrarotspektroskopie
J	Kopplungskonstante/Kopplung
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KOAc	Kaliumacetat
KOH	Kaliumhydroxid
KS	Ketosynthase
LM	Lösungsmittel
m/z	Masseladungszahl
MBq	Megabecquerel
MeCN	Acetonitril

MeOH	Methanol
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MHz	Megahertz
min	Minuten
MMMS	Monomethylmalonsäure
MMMSE	Monomethylmalonsäureester
MRSA	methicillin- oder multiresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	mass spectrometry (Massenspektrometrie)
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie (erste Generation von Tochter- ionen)
MS ⁿ	Tochterionen-Massenspektrometrie (n-te Generation von Tochterionen)
N	Normal
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bestimmbar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>Nde</i> I	Endonuklease aus <i>Neisseria denitrificans</i>
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat
NMR	nuclear magnetic resonance (Kern-Resonanz-Spektroskopie)
NOESY	Nuclear overhauser enhancement spectroscopy
<i>Not</i> I	Endonuklease aus <i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
NP	Normalphase
<i>p</i>	para
PBS	phosphate buffered saline
PCA	Perchlorsäure
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PKS	Polyketidsynthase
ppm	parts per million
PVC	Polyvinylchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROESY	rotating frame-overhauser enhancement
RP	reverse phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
RUL	relative Lichteinheit

s.	siehe
<i>Sac I</i>	Endonuklease aus <i>Streptomyces achromogenes</i>
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SC	Säulenchromatographie
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smp.	Schmelzpunkt
<i>sp</i>	Hybridorbitale
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS/Acetat/EDTA-Puffer
Tcm C	Tetracenomycin C
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Umdrehungen
UV/Vis	Ultraviolett/visible-Spektroskopie
VE	voll entsalzt
VRE	vancomycinresistenter <i>Enterococcus faecalis</i>
WHO	World Health Organisation
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid
X-Ray-Analyse	Röntgenstrukturanalyse
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
zpE	zytopathischer Effekt

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	ANTIBIOTIKA-DEFINITION.....	1
1.2	ANTIBIOTISCHE WIRKSTOFFE AUS MIKROORGANISMEN.....	1
1.3	GESUNDHEITSPOLITISCHE ASPEKTE DER ANTIBIOTIKA-THERAPIE.....	4
1.4	ENTWICKLUNGEN ZUR ÜBERWINDUNG VON RESISTENZEN.....	8
2	ZIELSETZUNG.....	12
3	RESULTATE UND DISKUSSION	13
3.1	DER PRODUKTIONSSTAMM	13
3.2	VORSCREENING.....	13
3.3	FERMENTATION.....	14
3.4	ISOLIERUNG DER CERVIMYCINE AUS DEM SUBSTANZKOMPLEX	14
3.4.1	<i>Entwicklung einer Isolierungsstrategie.....</i>	<i>14</i>
3.4.2	<i>Isolierungsstrategie.....</i>	<i>15</i>
3.5	STRUKTURAUFKLÄRUNG DER CERVIMYCINE.....	17
3.5.1	<i>Die Hauptkomponenten.....</i>	<i>17</i>
3.5.1.1	Cervimycin C (3).....	17
3.5.1.2	Cervimycin A (1).....	28
3.5.2	<i>Die homologen Cervimycine</i>	<i>32</i>
3.5.2.1	Cervimycin B (2) und D (4)	32
3.5.2.2	Cervimycin A- und Cervimycin C-methylester (14 und 15).....	34
3.5.2.3	Cervimycin K (11).....	35
3.5.2.4	Cervimycin J (10) und L (12).....	35
3.5.2.5	Cervimycin I (9).....	36
3.5.2.6	Cervimycin H (8).....	37
3.5.2.7	Cervimycin G (7) und Cervimycin M (13).....	37
3.5.2.8	Aglyka, Cervimycin E (5) und Cervimycin F (6).....	38
3.5.3	<i>Allgemeiner Überblick der Cervimycine.....</i>	<i>39</i>
3.6	DISKUSSION ZUR STRUKTUR DER CERVIMYCINE.....	41
3.6.1	<i>Strukturelle Besonderheiten der Cervimycine.....</i>	<i>41</i>
3.6.2	<i>Tautomerie im Ring A.....</i>	<i>44</i>
3.6.3	<i>Stereochemie der Monomethylmalonsäure</i>	<i>47</i>
3.7	BIOLOGISCHE AKTIVITÄT DER CERVIMYCINE.....	48
3.7.1	<i>Antibakterielle Testung.....</i>	<i>48</i>
3.7.2	<i>Antiproliferation und Zytotoxizität</i>	<i>51</i>
3.7.3	<i>Antivirale Testung.....</i>	<i>52</i>
3.7.4	<i>Einfluss auf die Phagozytoseaktivität</i>	<i>52</i>
3.7.5	<i>Funktionelle Transkriptions-Assays.....</i>	<i>53</i>
3.7.5.1	Einfluss der Tax/CREB Protein/Protein-Interaktion bzw. der Tax/CREB/LTR Protein/DNA-Interaktion.....	53
3.7.5.2	Einfluss der Interaktion des oncogenen c-Myc-Transkriptionsfaktors mit seinem Partnerprotein Max.....	54
3.7.5.3	Einfluss der Interaktion des oncogenen c-Myc-Transkriptionsfaktors mit seinem Partnerprotein Miz-1.....	55
3.7.6	<i>Spezielle Enzymtests.....</i>	<i>55</i>
3.7.6.1	Horse-radish Peroxidase (HRP)-Test.....	55
3.7.6.2	3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 α -HSD)-Test	56
3.7.7	<i>Zusammenfassung der nicht-antibakteriellen Testergebnisse.....</i>	<i>57</i>
3.7.8	<i>Spezielle Untersuchungen zur Erfassung des Wirktargets.....</i>	<i>58</i>

3.7.8.1	Interkalationstest.....	58
3.7.8.2	Metaboliteneinbautest: Aktivitätsstudien in intakten Zellen.....	61
3.8	DISKUSSION ZUR BIOLOGISCHEN TESTUNG DER CERVIMYCINE.....	65
3.8.1	<i>Struktur-Wirkungsbeziehungen in der antimikrobiellen Testung</i>	65
3.8.2	<i>Aussagen zum Wirktarget der Cervimycine - Betrachtung der Ergebnisse der antibakteriellen Testung gegen Keime mit definierter Tetracyclinresistenz und der Targettests</i>	66
3.9	BIOSYNTHESEUNTERSUCHUNGEN DER CERVIMYCINE.....	67
3.9.1	<i>Fütterungsversuche mit ¹³C-markierten Biosynthesevorstufen</i>	67
3.9.2	<i>Nachweis zur Biosynthese der Dimethylmalonsäure</i>	71
3.9.3	<i>Untersuchungen zur molekularen Basis der Cervimycinbiosynthese</i>	74
3.9.3.1	<i>Allgemeines zu Typ II PKS in der Biosynthese von aromatischen Polyketiden</i>	74
3.9.3.2	<i>Die Lokalisation der Cervimycin-Typ II PKS</i>	75
3.9.3.3	<i>Klonierung der cer Typ II PKS</i>	77
3.10	DISKUSSION ZU BIOSYNTHESE DER CERVIMYCINE.....	79
3.10.1	<i>Faltung und Substitution</i>	79
3.10.2	<i>Malonamat als Starter</i>	81
3.10.3	<i>Der Einbau verschiedener Starter durch eine Polyketidsynthase</i>	82
3.10.4	<i>Entstehung der Dimethylmalonsäure</i>	83
3.10.5	<i>Die cer PKS</i>	84
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	85
5	MATERIALIEN UND METHODEN	87
5.1	LISTE ALLGEMEIN VEWENDETER CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	87
5.2	LISTE SPEZIELLER AGENZIEN MOLEKULARBIOLOGISCHER ARBEITEN.....	88
5.3	LÖSUNGEN SPEZIELLER ZUSAMMENSETZUNG.....	89
5.4	LÖSUNGSMITTEL	90
5.5	ALLGEMEINE LABORGERÄTE	90
5.6	CHROMATOGRAPHISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE GERÄTE.....	91
5.7	VERBRAUCHSMATERIALIEN FÜR MIKROBIOLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	92
5.8	KULTURMEDIENTEN	92
5.8.1	<i>Kulturmedien – Fermenter</i>	92
5.8.2	<i>Kulturmedien - Schüttelkulturen für Fütterungsversuche</i>	92
5.8.3	<i>Kulturmedien - Molekularbiologie</i>	93
5.9	KULTIVIERUNG DES STAMMES HKI0179 8/2000 IM FERMENTER	93
5.10	ISOLIERUNG DER CERVIMYCINE AUS EINEM 180-LITER-FERMENTATIONSANSATZ....	94
5.11	INTERKALATIONSVERSUCH.....	95
5.12	METABOLITENEINBAUTEST	95
5.13	DURCHFÜHRUNG DER FÜTTERUNGSVERSUCHE.....	96
5.13.1	<i>Vorbereitung der ¹³C-markierten bzw. deuterierten Substanzlösungen</i>	96
5.13.2	<i>Fütterung der markierten Biosynthesevorläufer</i>	97
5.13.3	<i>Aufarbeitung der Schüttelansätze</i>	97
5.13.4	<i>Auswertung der NMR-Daten der markierten Cervimycine</i>	98
5.14	FERMENTATION DER MUTANTE <i>STREPTOMYCES TENDAE</i> HKI0179::PXU01 ZUM FUNKTIONSBEWIS DER CERVIMYCIN-POLYKETIDSYNTASE	100
5.15	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	100
5.15.1	<i>Isolierung der Mutanten-DNA</i>	100
5.15.2	<i>Asc I-Restriktionsansatz zum Verdau der Mutanten-DNA</i>	100
5.15.3	<i>Religierung der verdauten Mutanten-DNA</i>	101

5.15.4	<i>Transformation der Plasmide in E. coli XL1blue mittels Elektroporation</i>	101
5.15.5	<i>Mini- und Maxipräparation – Gewinnung der Plasmid-DNA aus E. coli</i>	101
5.15.6	<i>Shotgun-Bibliothek mit der 12 kb-Plasmid-DNA (Kolonie 3)</i>	102
5.15.7	<i>Ligation der 1-2 kb-DNA in pBluescript-Vektor II SK (+)</i>	103
5.15.8	<i>Sequenzierung der positiven Klone der pBluescript-Plasmide</i>	103
5.15.9	<i>Gelelektrophorese</i>	103
5.16	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	104
5.16.1	<i>Dünnschichtchromatographie (DC)</i>	104
5.16.2	<i>Säulenchromatographie (SC)</i>	104
5.16.3	<i>Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)</i>	104
5.16.4	<i>Gelpermeationschromatographie</i>	106
5.17	SPEKTROSKOPISCHE VERFAHREN	106
5.17.1	<i>UV-Vis-Spektroskopie (UV-VIS)</i>	106
5.17.2	<i>Massenspektrometrie (MS)</i>	107
5.17.3	<i>Kern-Resonanz-Spektroskopie (NMR)</i>	107
5.17.4	<i>Infrarotspektroskopie (IR)</i>	107
5.18	OPTISCHE DREHUNG.....	107
5.19	SCHMELZPUNKTBESTIMMUNG.....	108
5.20	CHEMISCHE METHODEN	108
5.20.1	<i>Hydrolyse von Cervimycin A zur Gewinnung von Cervimycin E</i>	108
5.20.2	<i>Hydrolyse von Cervimycin A zur Gewinnung von Cervimycin L und M</i>	108
5.20.3	<i>Hydrolyse von Cervimycin C zur Gewinnung von Cervimycin F</i>	108
5.20.4	<i>Totalhydrolyse von Cervimycin C zur Gewinnung der 2,3,6-Tridesoxyhexosen</i>	108
5.20.5	<i>Hydrazonfällung der 2,3,6-Tridesoxyhexosen (2,5-Dihydroxy-6-methyl-pyrane)</i>	109
5.20.6	<i>O-Methylierung von Cervimycin A (1)</i>	109
5.20.7	<i>O-Methylierung von Cervimycin C (3)</i>	110
6	LISTE VERWENDETER LITERATUR	111
7.	LISTE WISSENSCHAFTLICHER BEITRÄGE	118
8.	ANHANG	119

1 EINLEITUNG

1.1 Antibiotika-Definition

Der Begriff „Antibiose“ wurde erstmals durch Bary Ende des 19. Jahrhunderts geprägt und bedeutet sinngemäß „gegen etwas Lebendes gerichtet. Antibiotika sind nach der ursprünglichen Definition natürliche Stoffwechselprodukte von Bakterien und Pilzen, die andere Mikroorganismen abtöten oder an ihrem Wachstum hindern. Extensive Entwicklungen von partial- und totalsynthetischen Antibiotika erweiterten diesen Begriff. Außerdem wurde die alleinige mikrobielle Herkunft der Antibiotika durch zahlreiche antimikrobielle Substanzen aus Pflanzen, Tieren (Reptilien, Amphibien) oder marinen Organismen (Porifera oder Mollusca) in Frage gestellt (Gräfe, 1992; Berdy, 1989). Unter heutiger Sichtweise verwendet man Antibiotika als Sammelbegriff für Stoffe, die eine Wirkung gegen Bakterien, Pilze, Viren und phylogenetisch höhere Organismen (z.B. Rickettsien, Trypanosomen oder Parasiten) zeigen. Lancini et al. (1982) treffen mit ihrer Formulierung am besten die aktuelle Meinung. *Antibiotika sind strukturell verschiedene chemische Verbindungen, die inhibitorische Aktivität gegen Mikroorganismen, Viren und eukaryotische Zellen aufweisen und die, von Ausnahmen abgesehen, dem Sekundärstoffwechsel lebender Organismen entstammen.*

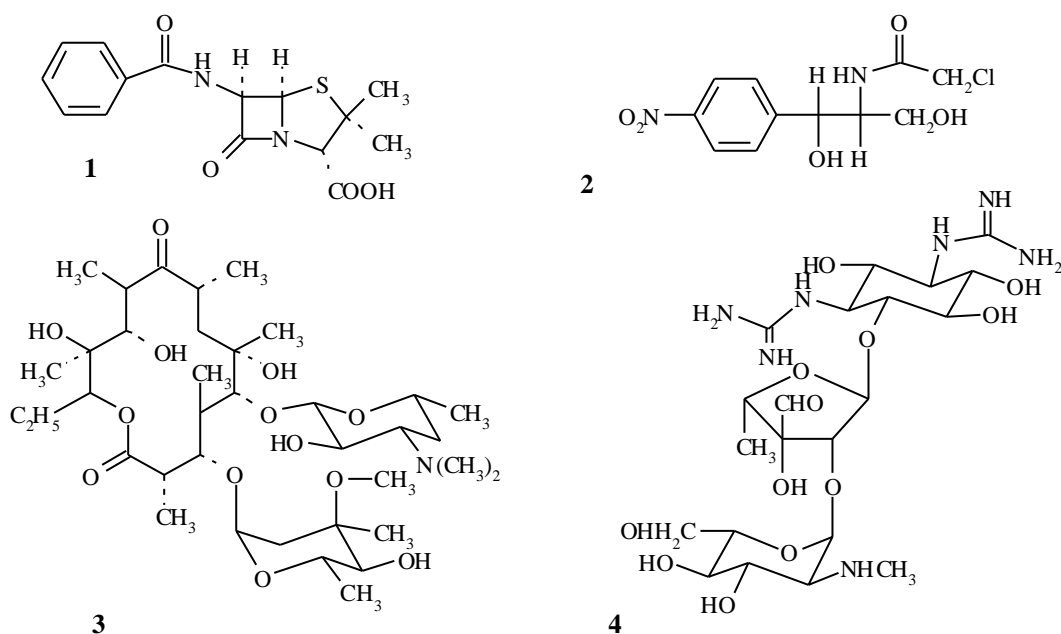
1.2 Antibiotische Wirkstoffe aus Mikroorganismen

Auf der Basis der stürmischen Entwicklung der Bakteriologie Ende des 19. Jahrhunderts und der zufälligen Entdeckung des Penicillins 1928 durch A. Fleming wurde das therapeutisch nutzbare Prinzip der Antibiose ins Bewusstsein der Menschen gebracht (Fleming, 1929). Die Nutzung des Penicillins als Wundtherapeutikum während des zweiten Weltkrieges leitete den Beginn mikrobiell gewonnener Wirkstoffe in der Arzneimittelforschung ein, deren Gewinnung Vorteile gegenüber pflanzlichen Inhaltsstoffen mit sich brachte, wie die Kultivierung im Großmaßstab und die Beeinflussung der Wirkstoffproduktion durch die Wahl der Kultivierungsbedingungen. Die Suche von antimikrobiellen Wirksubstanzen in Mikroorganismen stand fortan im Mittelpunkt der Naturstoffforschung.

Von den bisher mehr als 7000 bekannten bioaktiven Sekundärmetaboliten mikrobiellen Ursprungs wurden 30 % aus Pilzen (20 %) und sporogenen Bacilli (10 %) gewonnen, und 70 % stammen allein aus der Bakterienordnung Actinomycetales, in der *Streptomyces* die größte antibiotikaproduzierende Gattung darstellt (Gräfe, 1992). Die Auffindung des Streptothricins und Streptomycins in den 40er Jahren in Streptomyceten-Spezies leitete eine Welle intensiver Bemühungen auf der Suche nach antibiotischen Wirkstoffen in

Streptomyceten ein, die über Jahrzehnte anhielt und die Anzahl neuer Streptomycetenarten und gleichzeitig neuer Antibiotika erweiterte (Watve et al., 2001). Der große Erfolg ist im Wesentlichen auf das ubiquitäre Vorkommen und die hohe Biodiversität der Streptomyceten zurückzuführen, deren genetischer Pool zur Produktion verschiedener biologisch aktiver Sekundärmetaboliten befähigt ist.

Naturstoffe aus Mikroorganismen zeigen eine große chemische Diversität und vielfältige biologische Aktivitäten, die im Angriff spezieller Enzyme und Rezeptoren außerhalb des Mikroorganismus das Überleben gegen Konkurrenten sichern sollen. Viele dieser Substanzen haben als Therapeutika Einzug in die Medizin gefunden oder dienen als Leitstrukturen zur Herstellung von semi- und totalsynthetischen Pharmaka. Zu den bekanntesten aus Mikroorganismen gewonnen Antibiotika zählen die β -Lactame, wie die Penicilline [Penicillin G (**1**)] und Cephalosporine, die wohl die umfangreichste halbsynthetische Modifikation aller Antibiotika erfahren haben, um die Defizite der natürlichen β -Lactame, wie die β -Lactamase-Labilität zu überwinden (Demain et al., 1983). Andere mikrobiell gebildete Antibiotika, die pharmazeutischen Nutzen hatten oder immer noch haben, sind die Aminoglykoside (Streptomycin (**4**); Umezawa et al., 1982), Peptidantibiotika (Gramicidine; Kleinkauf et al., 1986), Glykopeptide (Teicoplanin), die große Gruppe der Polyketide, zu denen die Tetracycline (Oxytetracyclin; Hlavka et al., 1985), Anthracycline (Daunorubicin; Pribe, 1995) und Makrolide (Erythromycin A (**3**); Vanek et al., 1967) zählen, und Substanzen kleinerer Strukturklassen, wie das Chloramphenicol (**2**).



Da die Isolierung bekannter Substanzen stetig zunimmt, wird die Entdeckung neuer Sekundärmetaboliten in Zukunft zunehmend schwerer (Zaehner und Fiedler, 1995). Die Effizienz der Identifizierungsmethoden bestimmt die mögliche Ausbeute neuer Strukturen. Schnellere Nachweismethoden, z.B. verschiedene HPLC-gekoppelte Techniken (UV/NMR, UV/MS, UV/Vis) mit einem frühzeitigen Datenbankvergleich sollen den Arbeitsaufwand der Isolierung bekannter Substanzen vermeiden (Fiedler, 1993; Wolfender et al., 2003). Auch die Herangehensweise in der Auswahl und Bearbeitung der Mikroorganismen bestimmt den Erfolg mit. So versucht man, neue Stämme, im Besonderen der Actinomycetales, die als gute Wirkstoffbildner bekannt sind, aus ungewöhnlichen Habitaten (Polareis, Tiefsee, geothermale Spalten, dunkle Höhlen u.a.) zu isolieren, da die Adaptation des Stoffwechselhaushalts an die extremen Umweltbedingungen neue Sekundärmetaboliten erwarten lässt (Harvey, 2000). Eine weitere erfolgreiche Methode ist die OSMAC-Methode (One Strain/Many Compounds), in der das Synthesepotential eines einzelnen Stammes in Abhängigkeit verschiedener Kultivierungsbedingungen untersucht wird (Bode et al., 2002).

Das biologische Screening steht heutzutage gegenüber der Suche von Wirkstoffen nach rein chemischen Gesichtspunkten (chemisches Screening) im Vordergrund. Im klassischen Sinne bedeutet das die Testung eines Probenpools (Extrakte) gegen eine festgelegte Anzahl pathogener Keime im Plattendiffusionstest. Pharmafirmen setzen dabei auf das Hochdurchsatzscreening (HTS) im Mikrotiterplattenmaßstab, so dass mehrere Tausend Substanzen in einer Testlinie pro Woche untersucht werden können (Chapman, 2003). Die zunehmende Kenntnis krankheitsrelevanter Proteine aufbauend auf der Sequenzierung des Humangenoms erweitert hierfür zusehends die Anzahl Target-orientierter Testsysteme (Enzymassays, Rezeptorassays), die eine explizitere Einschätzung der pharmakologischen Wirkung gewährleisten (Kubinyi, 1995; The Celera Genomics Sequencing Team, 2001). Die Automatisierung brachte es mit sich, dass eine Auslastung der Assays nicht allein durch natürliche Substanzen gewährleistet werden konnte. Lange Zeit waren nur bis zu 5% des Substanzpools mit natürlichen Proben im Screening belegt, während die restlichen Verbindungen synthetisch mittels kombinatorischer Chemie gewonnen wurden (Müller et al., 2000). Diese von der Pharmaindustrie intensiv praktizierte „kombinatorische Chemie“ führte zu einer Eingrenzung oder Ablehnung in der Naturstoffsuche in den 90er Jahren. Der sichtliche Misserfolg dieser Leitlinie, erkenntlich an rückgängigen Zahlen eingeführter Arzneimittel pro Jahr, führt nun in jüngster Zeit wieder zu einer Rückbesinnung auf natürliche Substanzen.

Es wird postuliert, dass bisher etwa 1-10 % der kultivierbaren Mikroorganismen auf ihre Sekundärstoffwechselproduktion hin untersucht wurden (Demain, 2002). Die evolutionäre Anpassung führte zu einer Hochkonservierung genetischen Materials in verschiedenen Organismen. Somit hypothetisieren Tulp und Bohlin (2002), dass für alle wichtigen molekularen Targets im menschlichen Körper natürliche Wirkstoffe in anderen Spezies und sogar in mehr als einer Spezies existieren. Plausible Gründe, um auf der Suche nach neuen Arzneimitteln das gewaltige Potential der Naturstoffe zukünftig wieder verstärkt einzubeziehen (Cragg et al., 1997).

1.3 Gesundheitspolitische Aspekte der Antibiotika-Therapie

Bisher sind etwa 10 000 Antibiotika und ähnlich bioaktive Wirkstoffe aus natürlichen Quellen wie Pflanzen, Mikroorganismen und Tieren bekannt. Zusätzlich konnten noch über 100 000 partial- und totalsynthetische Derivate einiger weniger Antibiotikagruppen, wie β -Lactame, Makrolide, Aminoglykoside oder Tetracycline gewonnen werden. Aus diesem großen Fundus wurden bisher jedoch nur etwa 0,1 % als Produkte in die klinische Praxis eingeführt (Gräfe, 1992).

Antibiotika gehören mit zu den am häufigsten verwendeten Wirkstoffklassen in der Human- und Tiermedizin. Dem Arzneiverordnungsreport zufolge zählten sie 2003 neben Analgetika/Antirheumatika, Antihypertensiva und Magen-Darmmitteln an vierter Stelle zu den verordnungstärksten Medikamenten in Deutschland (Schwabe und Paffrath, 2003).

Einst galten sie als Wunderwaffe gegen Infektionskrankheiten und hatten einen großen Anteil an der Ausrottung epidemischer Erkrankungen, was zu einem generellen Anstieg der Lebenserwartung in Industrieländern führte. Lange Zeit hielt man Infektionskrankheiten für heilbar und kontrollierbar. Das Blatt hat sich jedoch in den letzten zwei Jahrzehnten gewendet, und Infektionen könnten in nächster Zeit auf Grund unzureichender Therapiemöglichkeiten zum lebensbedrohlichen Risiko werden.

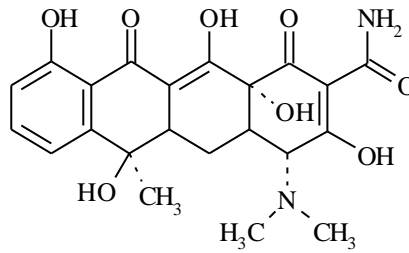
Die WHO-Statistiken verdeutlichen eine alarmierende Entwicklung infektiöser Erkrankungen. Zu den 20 häufigsten krankheitsbedingten Todesursachen der Weltbevölkerung zählen 17 Infektionskrankheiten. Allein für das Jahr 2001 waren mit 14,7 Millionen Todesfällen 26% der globalen Mortalitätsrate auf Infektionskrankheiten zurückzuführen. 78% davon wurden durch respiratorische Erkrankungen, Diarrhoe, Tuberkulose, Malaria und HIV verursacht (WHO, 2002). Von mehr als 300 bekannten Infektionskrankheiten sind nur 45 % einer Arzneimitteltherapie zugänglich. Außerdem wurden seit 1973 bis 1997 insgesamt 21 neue Humanpathogene entdeckt (Sonntag, 1997), und es kommen stetig mehr hinzu. Die im Februar 2003 aufgetretene Lungenkrankheit SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) und

ihre akute weltweite Ausbreitung ist ein aktuelles Beispiel unserer eingeschränkten Handlungsmöglichkeiten. Auch die in Industrieländern wieder aufgeflammt Infektionskrankheiten, die bereits als ausgerottet galten, sind problematisch, auch deshalb weil Arzneimittelentwicklungen nicht weiter verfolgt wurden und ein defensives Impfverhalten gegen solche Erreger (z.B. Tuberkulose) zu verzeichnen ist. Das Vorhaben, die Infektionskrankheiten innerhalb weniger Jahrzehnte unter Kontrolle zu bekommen, ist somit gescheitert.

Neben dem Auftreten neuer pathogener Erreger und der Inkompetenz, die Mehrzahl der vorherrschenden Infektionskrankheiten zu heilen, ist die rasante Entwicklung von Resistenzen ein ernstzunehmendes Problem. Dabei können Bakterien durch Mutationen Resistenzen erwerben und diese durch horizontalen Gentransfer auf andere Bakterien übertragen. Eine Selektion kann die Vermehrung und Verbreitung resistenter Erreger induzieren (Wiedemann, 2000). Die wesentlichste Ursache der Resistenzentwicklung ist die prophylaktische und die vielfach inadäquate Antibiotikatherapie in nichtinduzierten Fällen. So berichtete z.B. das wissenschaftliche Institut der AOK, dass im Jahr 2003 in Deutschland in ca. 80 % der Erkältungsfälle Antibiotika eingesetzt wurden, obwohl hinter den meisten dieser Erkrankungen, vor allem bei Kindern, unkomplizierte virale Infekte stecken. Um diese Falschanwendungen zu verhindern, wird verstärkt eine eindeutige Indikationsstellung bei Infektionen zum Einsatz des richtigen Antibiotikums gefordert.

Schon in den späten 50er Jahren waren bis zu 85 % der hospitalen pathogenen Staphylokokken penicillinresistent, und Resistenzen gegen andere Antibiotika folgten wenig später nach ihrer Einführung (Neu et al., 1992). Kreuzresistenzen verursachten den Ausfall ganzer Antibiotikagruppen, wie z.B. die Sulfonamide, in der Behandlung bestimmter Infektionen. Seither begann der „Wettlauf“ zwischen Mensch und Mikrobe, der zu einer Intensivierung in der Antibiotikasuche führte (Hlavka et al., 1985). Jedoch wurde dabei die schnelle Entwicklung multiresistenter, meist Gram-positiver Bakterien unterschätzt und die Fokussierung der Antibiotikaentwicklung speziell gegen die schwer behandelbaren Gram-negativen Keime in den 70er und 80er Jahren resultiert seit den 90ern in limitierten Behandlungsmöglichkeiten von Erkrankungen, die durch hochresistente Gram-positive Bakterien verursacht werden (Bassetti et al., 2002).

Eine erschreckende Bilanz in der Resistenzentwicklung zeigt sich dabei gegen breitspektral wirksame Antibiotika, wie die Tetracycline (5), die stets als Hoffnungsträger galten.



5

Die eingeschränkte Tetracyclinwirksamkeit basiert u.a. auf der in der Vergangenheit extensiven Verwendung als Wachstums promotoren in der Masttierzucht, der subtherapeutischen Langzeitanwendung bei nichtinfektiösen Erkrankungen (z.B. Akne) und dem Einsatz zur Prophylaxe bei Respirationserkrankungen (u.a. *Chlamydia pneumoniae*). Außerdem steigert der geringe Preis die Attraktivität der Tetracycline und macht sie für die meisten Länder erschwinglich. Die dadurch unkontrollierbare breitflächige Anwendung ist ein weiterer Grund für das Auftreten tetracyclinunempfindlicher Bakterien. Diese besitzen *tet* Gene, die für Efflux- und Targetresistenzmechanismen kodieren, um die Tetracyclinwirkung zu umgehen. Entweder befördern membranassoziierte Proteine (Effluxpumpen) die Tetracycline aktiv aus den Zellen und senken die intrazelluläre Antibiotikakonzentration, oder es kommt zum Schutz des ribosomalen Targets durch zyttoplasmatische Proteine (Targetprotektoren), die die Hemmung der ribosomalen Proteinsynthese durch die Tetracycline verhindern (Chopra et al., 2001; Bolhuis et al., 1997). Die besondere Gefahr besteht im Auftreten von Tetracyclinkreuzresistenzen. Außerdem kann die gekoppelte Übertragung von Genen für die Tetracyclinresistenz und anderer Antibiotikaresistenzen zu multiplen Unempfindlichkeiten, wie z.B. zusätzlich gegen Makrolide, Lincosamide oder Streptogramin B führen (Roberts, 2003; Clewell et al., 1995). Außerordentlich kritisch ist darüber hinaus die aktuelle Resistenzsituation bei nosokomialen Keimen. Dabei handelt es sich zumeist um fakultativ pathogene Bakterien, die bei hospitalisierten, immungeschwächten Patienten Infektionen hervorrufen, die bis zum Tod führen können. Klassische Hospitalkeime sind vor allem methicillinresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) und multiresistente Isolate von verschiedenen Arten der Enterobacteriaceae (Kayser et al., 1998). Die bei diesen Keimen auftretenden Multiresistenzen erschweren die Behandlung auf Grund eingeschränkt anwendbarer oder nicht mehr zur Verfügung stehender Therapeutika. Neueste Präventionsrichtlinien, welche ein strenges Regime in der Umsetzung verstärkter Hygienevorschriften und Routinekontrollen in Krankenhäusern und die schnelle Isolierung infizierter Patienten umfassen (Wagenvoort,

1999; WHO, 1999; Mitteilungen der Kommission für Krankenhaushygiene, 1998), sollen zur Verringerung der Infektionen beitragen. Zur medikamentösen Behandlung stehen häufig nur noch Reserveantibiotika zur Verfügung, wie das Vancomycin, welches bei schwerwiegenden Infektionen mit multiresistenten Staphylokokken das letzte Mittel der Wahl darstellt. (Wilhelm et al., 1999). Dieses Glykopeptid verhindert die durch eine Transpeptidase vermittelte Quervernetzung der Peptidoglykanstrukturen im letzten Schritt der Zellwandbiosynthese, was zu einem Verlust der Zellwandstabilität und dem Absterben der Bakterien durch Zellyse führt (Walsh et al., 1993; **Abb. 1**).

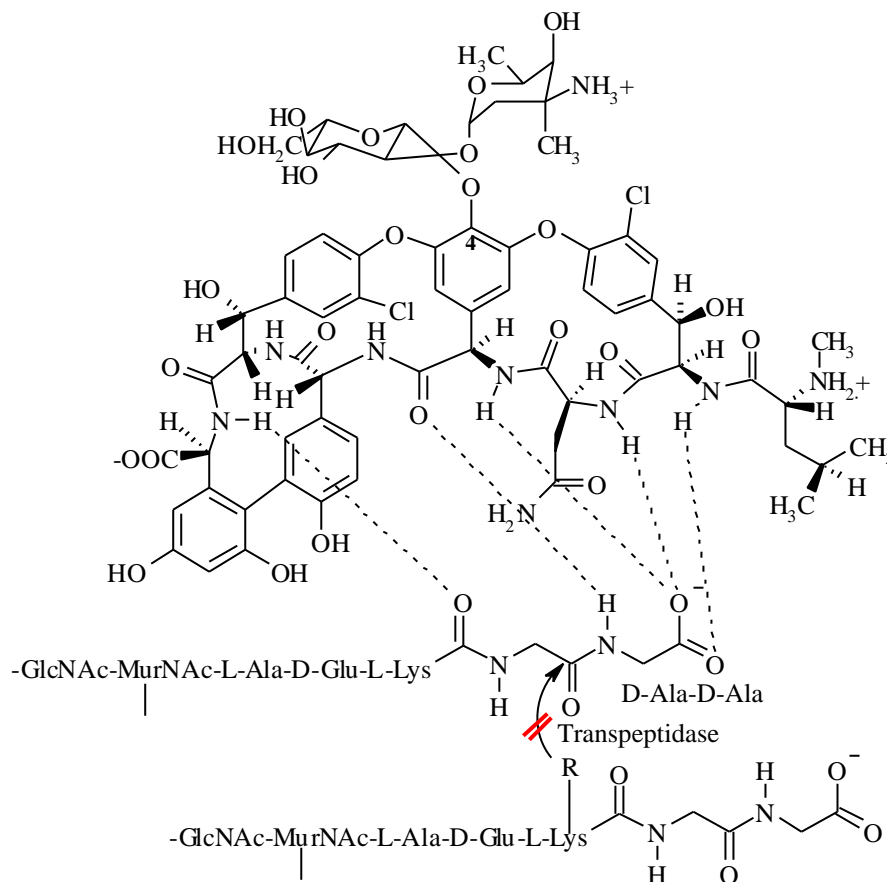


Abb.1 Wechselwirkung des Vancomycin (Monomer) mit D-Ala-D-Ala der Pentapeptidseitenkette der Peptidoglykanvorstufen, Verhinderung der Quervernetzung der Mureinbestandteile.

Das erhöhte Vorkommen von MRSA in den 80er Jahren, in manchen Gebieten z.T. >50 % (Asien, Osteuropa), führte zu einem gesteigerten Gebrauch von Vancomycin, natürlich mit der erhöhten Gefahr einer Resistenzentwicklung (Voss et al., 1994). 1988 wurden erstmals vancomycinresistente Enterokokken (VRE) mit dem VanA-Resistenzgen beschrieben (Leclercq et al., 1988). Dieses ist gegenüber den anderen Vancomycinresistenzen (VanB, C, D, E) mit bis zu 70 % am meisten in VRE verbreitet (Clark et al., 1993) und spielt in der

Weitergabe auf andere Stämme eine wesentliche Rolle. Der lange Zeit gefürchtete interspezifische Transfer der VanA-Resistenz von Enterokokken auf multiresistente Staphylokokken bewahrheitete sich im Juni 2002 in einem *S. aureus*-Isolat in den USA (Michigan; Chang, 2003), dem kurze Zeit später der zweite Fall im September 2002 (Whitener et al., 2004) folgte. Durch diese erschreckende Entwicklung geraten bisher behandelbare Infektionen außer Kontrolle, und Wissenschaftler befürchten eine Rückkehr in die präantibiotische Ära (Williams et al., 1999).

Vor diesem alarmierenden Hintergrund muss die kontinuierliche Entwicklung neuer Antibiotika zur Bekämpfung bestehender Infektionskrankheiten und zur Überwindung von Resistenzbarrieren intensiv verfolgt werden. Dabei kommt der Auffindung neuer antibiotischer Wirkorte eine außerordentliche Bedeutung zu. Für die Targetidentifikation eines neuen Antibiotikums und für die Bewertung seines Potentials zur Umgehung bestehender Resistenzstrategien ist die Orientierung an bereits gebräuchlichen Antibiotika notwendig.

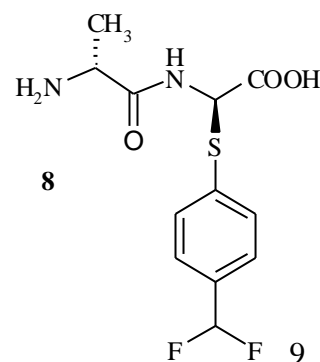
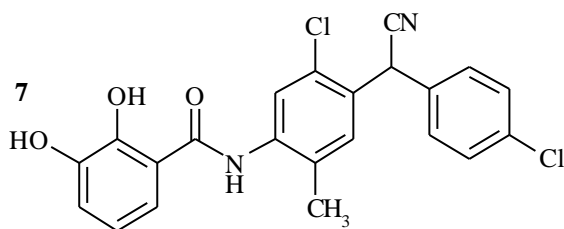
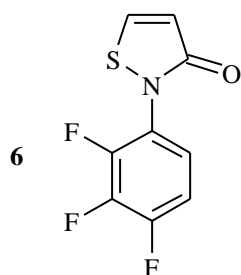
1.4 Entwicklungen zur Überwindung von Resistenzen

Im Handel befindliche Antibiotika wie Carbapeneme, defluorierte Chinolone oder die Ketolide mit dem kürzlich eingeführten Telithromycin sind im Moment noch wirksame Waffen gegen Bakterien, die gegen klassische Wirkstoffe, wie Penicilline oder Tetracycline resistent sind bzw. multiple Resistenzen aufweisen. Jedoch wird auch für diese noch effektiven Wirkstoffe die Entwicklung oder die Ausbreitung bereits bestehender Unempfindlichkeiten (z.B. Chinolonresistenz) eine Frage der Zeit sein. Vielversprechend sind die in der klinischen Entwicklung befindlichen Glycylcycline, die durch Substitution eines Peptidrestes in den Tetracyclingrundkörper zu einer erhöhten Penetration durch die Zellwand befähigt sind und eine 5-fach stärkere Bindung an prokaryotischen Ribosomen zeigen als z.B. Minocyclin (Mitscher et al., 1987). Ihre Wirkung richtet sich gegen aerobe oder anaerobe Gram-negative und Gram-positive Stämme mit Tetracyclin-Efflux- und Targetresistenz, schließt aber auch eine exzellente Aktivität gegen vancomycinresistente und multiresistente Enterokokken und multiresistente Staphylokokken ein (Sum et al, 1998). Ob die Glycylcycline jedoch auf lange Zeit eine effektive Alternative darstellen, ist auf Grund der Strukturhomologie und dem äquivalenten Target zu den Tetracyclinen und der schnellen Anpassungsfähigkeit der Bakterien zu bezweifeln.

In der Auffindung neuer Antibiotika speziell im Kampf gegen die Glykopeptidresistenz haben sich in dem letzten Jahrzehnt drei Strategien entwickelt, die die vielfältigen Anstrengungen in der Bearbeitung dieses Themas widerspiegeln (Gao, 2002).

Mit der ersten Strategie versucht man, Vancomycinanaloga mit verbesserten Wirkeigenschaften über chemische oder biosynthetische Prozesse, so auch durch gezielte kombinatorische Biosynthese, zu gewinnen. Obwohl das Wesen der Vancomycinresistenz vermuten ließ, dass abgewandelte Glykopeptidantibiotika keine ausreichende Aktivität gegen die resistenten Keime besitzen, versuchte u.a. die Fa. Eli Lilly in Indianapolis natürliche Glykopeptide zu modifizieren. Eli Lilly synthetisierte auf der Basis des Glykopeptids Chloroeremycin unter Einführung einer hydrophoben Seitenkette das vielversprechende Produkt LY333328 (Cooper et al., 1996). Es wirkte 50mal stärker gegen VRE und 4-8mal stärker gegen MRSA im Vergleich zu Vancomycin (Nicas et al., 1996).

Die zweite Möglichkeit ist die Entwicklung von Inhibitoren der resistenzvermittelnden Enzyme (VanS, R, A, X und H) und somit die Wiederherstellung der Glykopeptidwirksamkeit. Das an der VanA-Resistenz beteiligte regulatorische Zwei-Komponentensystem VanRS z.B. ist ein guter Angriffspunkt chemotherapeutischer Intervention, da homologe Proteine nur in Hefen und Pilzen, aber nicht in höheren Eukaryonten zu finden sind (Barrett et al., 1998; Alex et al., 1996). Seine Blockade führt zu einem Stopp der Expression nachfolgender Enzyme der Resistenzkaskade. Dafür konnten im Labor Mustersubstanzen entwickelt werden, wie das Halophenylisothiazolon LY-266,400 (**6**; Ulijasz et al., 1999), verschiedene Tyramine, das Dodecamerpeptid E12 (Ulijasz et al., 2000) und die Salicylanilide (**7**; Macielag et al., 1998), die neben der VanRS-Transduktionshemmung selbst wachstumshemmende Eigenschaften gegen VRE haben. Zur Blockade des Enzyms VanA, einer Ligase, wurden Phosphinatdipeptide und Phosphonatanaloga untersucht, die jedoch nur eine geringe Affinität zeigten. Die Peptidase VanX mit einem Zn^{2+} im aktiven Zentrum wird durch Substanzen inaktiviert, die selbst eine Bindung mit dem Metallion eingehen. Dazu gehören Dithiole oder ein fluoriertes Dipeptid (**8**), das durch kovalente Enzymwechselwirkung eines hochreaktiven Intermediates irreversibel hemmt (Aráoz et al., 2000). Inhibitorische Substanzen von VanH sind Oximate (Marshall et al., 1999).



Eine mögliche Applikation dieser enzymhemmenden Verbindungen könnte nur als Kombipräparation mit einem Glykopeptid in Analogie der simultanen Gabe von Lactamaseinhibitoren mit Penicillinen erfolgen. Obwohl die Salicylanilide als durchaus vielversprechende Templates zur Erzeugung von VanRS-Inhibitoren der nächsten Generation angesehen werden, ist die Umsetzung zur klinischen Anwendbarkeit ein fernes Ziel.

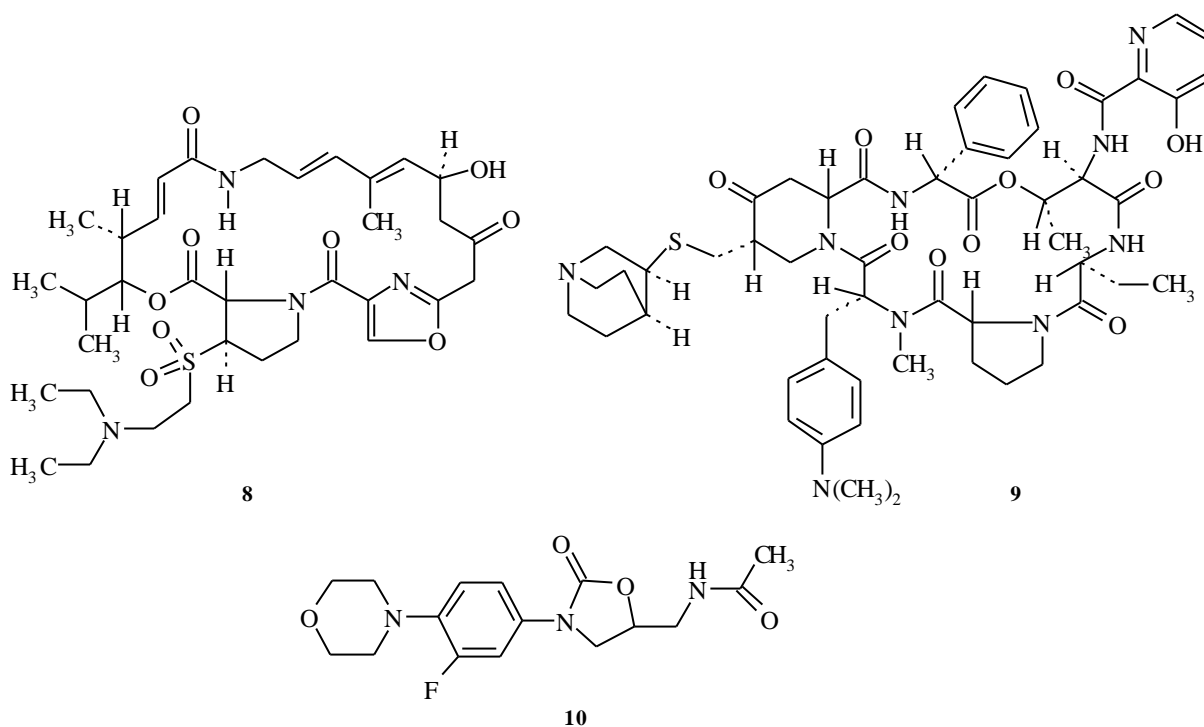
Die dritte Strategie beschäftigt sich mit der Suche nach Therapeutika, die an neuen Targets im bakteriellen Zellzyklus interagieren, an denen bisher konventionelle Antibiotika nicht angreifen. Seit den 70er Jahren konnte nur eine neue Antibiotikagruppe mit einem neuen Wirktarget gefunden werden, die in die klinische Praxis eingeführt wurde (Boneca et al, 2003). Eine Tatsache, die uns alternative Wege gehen lässt, d.h. neue Strukturen mit verbesserter Wirkung an bereits bekannten Targets zu suchen oder altbekannte Substanzen wiederzubeleben oder aus ihnen verbesserte Versionen zu entwickeln (**Tab. 1**).

Tab.1 Neue antibiotische Substanzen gegen vancomycinresistente Keime.

Antibiotikum	Antibiotikaklasse	Aktion/ Inhibition	Target	Spektrum	Resistenz
Quinupristin/ Dalfopristin	Streptogramine	Protein- synthese	23S rRNA (Domäne V) ribosomales Protein L24	Gram+ Kokken Mit Ausnahme von <i>E. faecalis</i>	Mutationen von: 23S rRNA, Rpl24, Erm Methylase, VatA-E, Acetyltransferase, VgbA-Blyase, VgaA-Av-B, LsA, MrsA, MrsC ABC Transporter
Linezolid	Oxazolidinon	Protein- synthese	23S rRNA (Verhindert Initiations- komplex)	Gram+ Mykobakterien	Mutationen in 23S rRNA
Evernimicin	Orthosomycin	Protein- synthese	23S rRNA (IF-2- Bindungs- stelle)	Gram+ Mykobakterien	Mutationen in 23S rRNA und Rpl16. EmtA Methylase
Ramoplanin	Lipoglykodepsi- peptide	PG- Synthese	PG-Lipide I/II	Gram+	keine
Daptomycin	Zyklisches Lipo- peptid	Membran	Teichonsäure- Synthese AS-Transport	Gram+	Wenig aufgetreten Veränderungen im Membranpotential

ABC: ATP-Bindungskassette; IF: Initiationsfaktor; PG: Peptidoglykan.

Ein „neues Altbekanntes“ ist z.B. das Quinupristin (8)/Dalfopristin (9)-Kombipräparat (30/70), das 1999 unter dem Namen SynercidTM zur Behandlung von Infektionen vancomycinresistenter Bakterien eingeführt wurde.



Beide sind semisynthetische Produkte der Streptogramine mit verbesserter Löslichkeit, die zusammen bacterizid durch synergistische Hemmung der Proteinsynthese gegen *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *E. faecium*, vor allem gegen VanA und VanB-Isolate wirken (Cocito et al., 1997; Bryson et al., 1996). *E. faecalis* hingegen besitzt eine natürliche Resistenz gegen SynercidTM. Um Selektionen hochresistenter Keime zu vermeiden, welche auf Grund der bereits bestehenden Resistenzen gegen die seit 1954 bekannten Streptogramine A und B entstehen können, soll es als letzter Ausweg gegen multiresistente Keime angesehen werden bzw. Behandlungen anderer Infektionen nur unter gleichzeitiger Gabe anderer Antibiotika (u.a. **b**-Lactame) erfolgen (Vouillamoz et al., 2000). Ähnliches gilt auch für das vollsynthetische Oxazolidinon Linezolid (**10**; ZyvoxTM), ein Proteinsynthesehemmer, der seit 2000 gegen MRSA und vancomycinresistenten *E. faecium* zum Einsatz kommt. Die bakteriostatische Wirkung und das bereits sporadische Auftreten von VRE- und sogar MRSA-Resistenzen limitiert seine Anwendung gegen diese ernstzunehmenden Keime (Gonzales et al., 2001; Tsiodras et al., 2001). Die stetige Resistenzzunahme in Enterokokken gegen die Orthosomycine wird durch den Gebrauch des verwandten Antibiotikums Avilamycin als Wachstumspromotor in Tieren induziert (Aarestrup, 1998).

Zur Zeit befinden sich somit keine optimal verlässlichen Lösungen auf dem Markt. Auch bringen die in der klinischen Phase III befindlichen Zellwandinhibitoren Ramoplanin und Daptomycin wahrscheinlich nur für kurze Zeit Hoffnung, so dass ein dringender Handlungsbedarf in der antibiotischen Präparateentwicklung besteht.

2 ZIELSETZUNG

Um neue antibiotische Wirkstoffe in Mikroorganismen zu finden, wurden in vorgelagerten Untersuchungen Extrakte verschiedener Actinomyceten, welche in steinzeitlichen Höhlen isoliert wurden, auf ihr antimikrobielles Spektrum hin untersucht. Im gezielten biologischen Screening konnte für ein Isolat eines Streptomyceten, der taxonomisch eine hohe Homologie zur Art *Streptomyces tendae* aufwies, eine verstärkte Wirkung gegen schwerwiegende nosokomiale Keime sowie verschiedene pathogene tetracyclinresistente Bakterien detektiert werden.

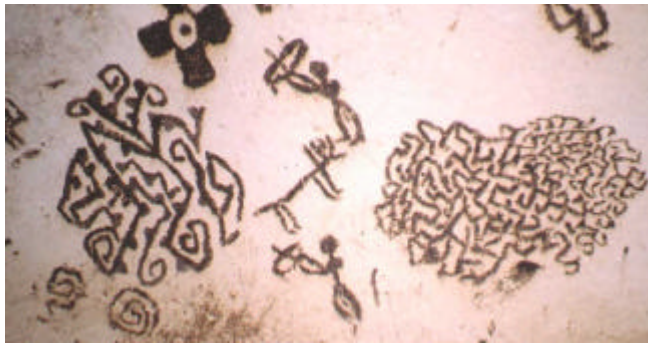
Ziel dieser Arbeit war es,

- 1 die mikrobiellen Naturstoffe aus dem betreffenden Stamm *Streptomyces tendae* HKI0179 zu isolieren und zu separieren. Dazu sollte unter Verwendung klassischer Extraktions- und Trennmethoden (DC, HPLC u.a.) eine geeignete Isolierungsstrategie entwickelt werden.
- 2 die Strukturen der isolierten Einzelverbindungen mit Hilfe unterschiedlicher Methoden der Massenspektrometrie und NMR Spektroskopie aufzuklären und physikochemisch näher zu charakterisieren.
- 3 das Produktspektrum, wenn möglich, durch chemische Modifikation an funktionellen Gruppen der Strukturen zu erweitern.
- 4 das Wirkpotential der gewonnen Verbindungen in der biologischen Testung gegen ausgewählte Gram-positive Bakterien einzuschätzen. Dabei war vorzugsweise die Wirksamkeit gegen nosokomiale Keime, wie multiresistenter *Staphylococcus aureus* und vancomycinresistenter *Enterococcus faecalis* zu untersuchen. Durch targetorientierte Tests sollten Hinweise auf den Wirkort erhalten werden, und das Wirkprofil an Hand nicht-antibiotischer Tests abgesteckt werden.
- 5 durch Fütterung mit Biosynthesevorläufern Informationen über den Biosyntheseweg der Verbindungen zu erhalten.
- 6 in molekularbiologischen Versuchen zusätzliche Einblicke in die Biosyntheseenzyme zu erhalten.

3 RESULTATE UND DISKUSSION

3.1 Der Produktionsstamm

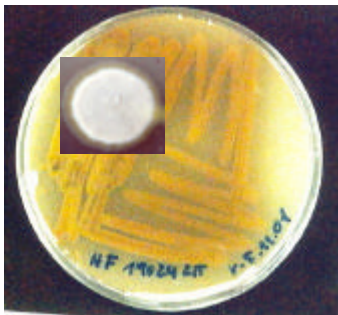
1997 wurden im Rahmen eines EU-Projektes zur Untersuchung des Einflusses von Klima und Mikroorganismen auf 5000 bis 15000 Jahre alte Wandmalereien in italienischen und



spanischen Höhlen biologische Proben entnommen. Der Stamm *Streptomyces tendae* HKI0179 konnte dabei an einer Felswand mit neolithischen Zeichnungen (Abb. 2) im Inneren der Höhle Grotta dei Cervi in Süditalien, nahe Porto Badisco, isoliert werden.

Abb. 2 Wandmalereien aus Fledermauskot (5000 Jahre alt) in der Grotta dei Cervi.

Die phänotypischen und phylogenetischen Eigenschaften des Stammes stimmten mit denen des Genus *Streptomyces* überein. Zudem wurden übliche chemotaxonomische Analysen von Zellwandbestandteilen zur taxonomischen Einordnung herangezogen. Die Sequenzierung der 16S rDNA ergab eine Übereinstimmung von 99,5 % zu der in der Genbank (NCBI, National Institute of Health, USA) enthaltenen *Streptomyces tendae* 16S rDNA. Die morphologische und physiologische Charakterisierung im Vergleich zu *Streptomyces tendae* IMET 40459



zeigten gute Übereinstimmungen. Der Stamm bildete einen dichten grauen Sporenrasen mit glatter Oberfläche. Die mikroskopische Gestalt der Einzelsporen ließ offene Spiralen mit durchschnittlich 3-7 Windungen erkennen. Auffällig war die intensiv gelbe Pigmentbildung als Indiz der Sekundärmetabolitenbildung (Abb. 3; Groth et al., 2001).

Abb. 3 *S. tendae* HKI0179.

3.2 Vorscreening

Das Rohextrakt von *Streptomyces tendae* HKI0179 fiel im biologischen Vorscreening durch seine sehr gute Wirkung gegen Gram-positive Keime, insbesondere gegen multiresistenten *Staphylococcus aureus* 134/94 und vancomycinresistenten *Enterococcus faecalis* 1528 auf. Darüber hinaus war eine sehr gute Aktivität gegen tetracyclinresistente Bakterien erkennbar. Diese entscheidenden Ergebnisse gaben Anlass zur Suche des oder der wirksamen Sekundärmetabolite(n).

3.3 Fermentation

Da der Wildstamm unzureichende Mengen der wirksamen Sekundärmetaboliten produzierte, wurde eine adäquate Anzahl natürlicher Selektanten des Stammes *S. tendae* HKI 0179, die nach phänotypischen Kriterien der Sporen- und gelben Pigmentbildung ausgewählt wurden, in verschiedenen Nährmedien getestet. Die Selektante *S.tendae* HKI0179 8/2000 erwies sich auf Cornsteep-Medium (HAM5) als Hochproduzent und wurde für alle Fermentationen (Kap. 5.9) verwendet.

3.4 Isolierung der Cervimycine aus dem Substanzkomplex

3.4.1 Entwicklung einer Isolierungsstrategie

Mit geringen Ausbeuten des gelben Substanzkomplexes aus kleinen Fermentationsansätzen von *Streptomyces tendae* HKI0179 wurden analytische Voruntersuchungen durchgeführt.

Die gute Löslichkeit des Komplexes in organischen Lösungsmitteln, wie Methanol, Chloroform, Ethylacetat und Acetonitril bot eine günstige Voraussetzung für die übliche Aufarbeitung und Analytik. Lösungsuntersuchungen bei verschiedenen pH-Werten gaben Hinweise auf schwache Säuren. Die gelben Substanzen erwiesen sich als nahezu unlöslich in Wasser und Säuren. Die Löslichkeit verbesserte sich jedoch im schwach Alkalischen unter Farbumschlag von gelb nach violett, welcher unter Säureeinfluss reversibel war. Dieses lässt sich durch Salzbildung (Phenolat) saurer Phenolgruppen in Nachbarschaft zu chinoiden Carbonyl-Kohlenstoffen (bevorzugt Naphthochinone) mit einer Veränderung der Elektronenmesomerie (geringere Absorptionsenergie) im schwach Basischen erklären. Die Protonierung durch verdünnte Säuren führte rückwirkend zum Phenol. Der Effekt wurde zur DC-Detektion mit Ammoniakdämpfen genutzt. Für die Extraktion mit Ethylacetat konnte bei pH 5,0 der wässrigen Substanzlösung an Hand der gelben Eigenfarbe ein quantitativer Übergang in die organische Phase gefunden werden. pH-Werte unterhalb ca. 3,0 führten unter Farabschwächung offensichtlich zu irreversiblen Veränderungen des Substanzen, da nachfolgende Einstellung auf pH 5,0 keine vollständige Aufnahme in das Ethylacetat zur Folge hatte.

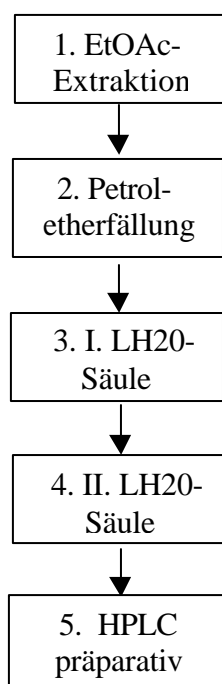
Versuche mit verschiedenen Laufmittelgemischen an Normalphasen-DC (Kap. 5.16.1) ergaben nur unbefriedigende Trennungen und führten darüber hinaus präparativ zu deutlichen Substanzverlusten. Gleiches Verhalten zeigte sich auch in der Säulenchromatographie (Kap. 5.16.2). Eine Steigerung des Methanolgehaltes im Laufmittelgradienten hemmte das Laufverhalten, da durch geringe Wassermengen im Methanol der pH des Kieselgels von ca. 7,3 zum Tragen kam, und das durch Wechselwirkung zwischen Substanz

und Kieselgel entstandene violette Phenolat nicht eluiert werden konnte. Die Verwendung von sauren Eluenten bzw. die Modifizierungen des Normalphasen-Kieselgels mit Oxalsäure (0,1 %, 0,5 % und 1 %) oder NaH_2PO_4 -Puffer konnte keine Verbesserung schaffen. Während NP-Kieselgel analytisch anfänglich zum Einsatz kam, war eine präparative Nutzung mittels DC-Platten oder säulenchromatographisch für die Substanzisolierung nicht möglich. RP-DC-Material erwies sich auf Grund der unzureichenden Zonenbildung (d.h. einheitliche Substanzfront) ebenfalls als ungeeignet.

Um die Trennprobleme zu umgehen, wurde eine RP-HPLC-Analytik optimiert. In Untersuchungen des Trennverhaltens mit verschiedenen Laufmitteln unter isokratischer und Gradientenelution erwiesen sich die unter Kap. 5.16.3 angegebenen Bedingungen als vorteilhaft. Während in der analytischen RP-HPLC die Verwendung von 0,1 %iger wässriger TFA-Lösung keine Probleme bereitete, wurde in der semipräparativen und präparativen RP-HPLC unter Berücksichtigung einer optimalen Substanztrennung vorzugsweise eine 0,01 N NH_4OAc -Lösung (pH 5,0) verwendet, um den chemischen Abbau der fraktionierten Substanzen zu verhindern. Die Trennung des gelben Substanzkomplexes via Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH20 unter Methanolelution (Kap. 5.16.4) konnte als attraktives Separationsverfahren etabliert werden.

3.4.2 Isolierungsstrategie

Mit dem Ziel einer maximalen qualitativen als auch quantitativen Isolierung der einzelnen Cervimycine aus einem Fermentationsgroßansatz (180 l; Kap. 5.9) von *Streptomyces tendae* HKI0179 8/2000 wurden die vorangegangenen Erkenntnisse herangezogen (**Abb. 4**;



Kap. 5.10). Es wurde der nach Abtrennung wasserlöslicher Substanzen erhaltene KF-Extrakt zum Ausschluss stark lipophiler Verunreinigungen einer Petroletherfällung unterworfen. Der im Fällungsprodukt angereicherte Pigmentextrakt unterlag über eine kleinere Säule mit Sephadex LH20 der gelchromatographischen Vorreinigung, und die dabei erhaltene wirksame gelbe Fraktion wurde durch wiederholte Gelchromatographie an einer erheblich größeren Säule fraktioniert. Anschließende Aufreinigung über präparative RP-HPLC der die Cervimycine enthaltenen Fraktionen (2-5) führte zu den Einzelsubstanzen Cervimycin A (**1**), B (**2**), C (**3**), D (**4**), F (**6**), G (**7**), H (**8**), I (**9**), J (**10**) und K (**11**). Die Cervimycine sind im chromatographischen Profil (**Abb. 5**) dargestellt.

Abb. 4 Aufarbeitungsschema der Cervimycine.

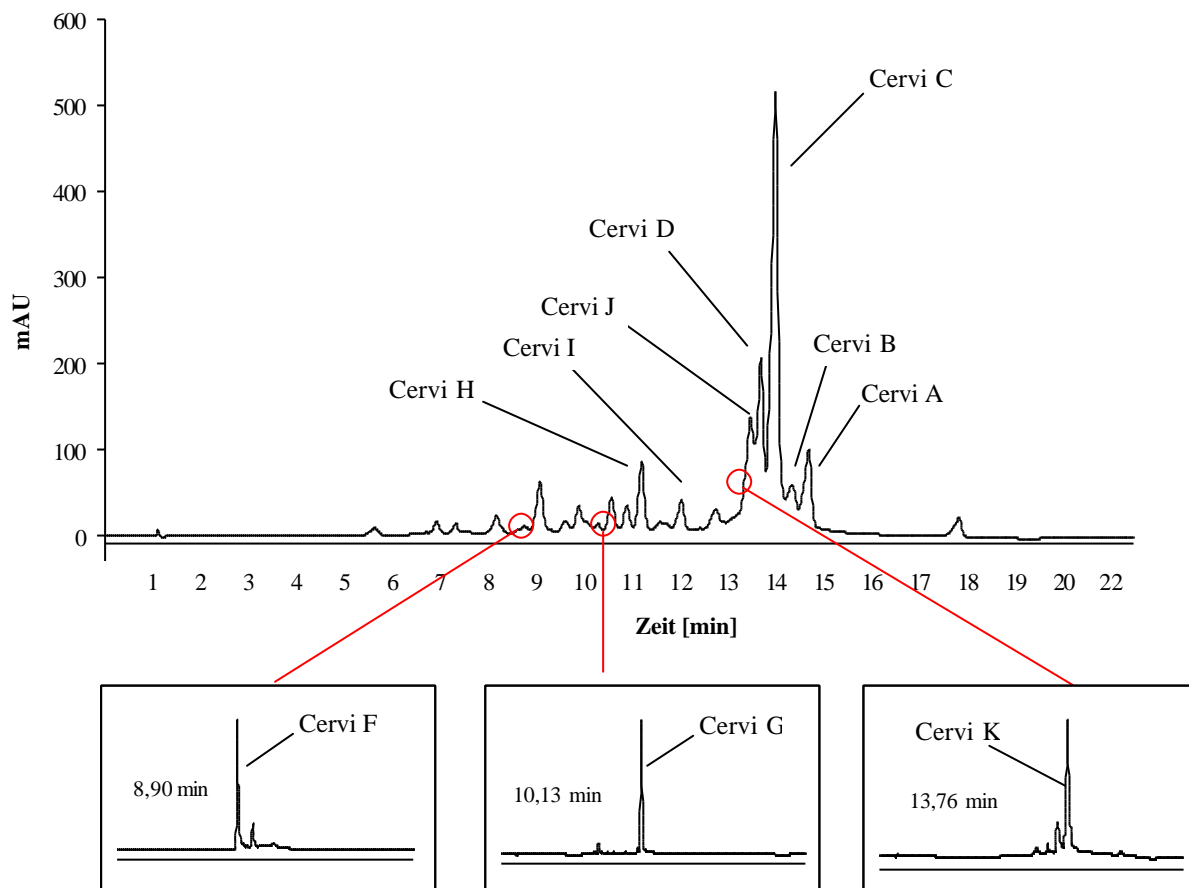


Abb. 5 Chromatographisches Profil (analytische RP-HPLC) des Rohextraktes bzw. der Cervimycine F, G und K nach weiterer Aufreinigung; Nucleosil 100-C18, 5 μ m (125 x 3mm), MeCN/TFA-H₂O (0,1 %)-Gradient (Kap. 5.16.3), 1 ml/min, λ =247 nm.

Somit konnten zehn Cervimycine aus dem Fermentationsprozess des *Streptomyces tendae* HKI0179 8/2000 gewonnen werden. Während die Cervimycine A (375 mg), C (1,6 g) und D (927mg) in höheren Konzentrationen gefunden wurden, lagen die Cervimycine B (33 mg), F (< 1 mg), G (10 mg), H (6 mg), I (13 mg), J (15 mg) und K (13 mg) als Minorkomponenten vor. Die Hauptkomponenten Cervimycine A und C wurden in einem Verhältnis von 1:4 vom Stamm gebildet.

Zum Zweck der unterstützenden Strukturaufklärung und des Erhaltes neuer strukturverwandter Substanzen und deren Zuführung zu biologischen Untersuchungen wurden die beiden Hauptkomponenten chemisch modifiziert. Durch hydrolytischen Abbau von Cervimycin A konnten die Cervimycine E, L und M erzeugt werden (Kap. 5.20.1; Kap. 5.20.2). Cervimycin F, das Aglykon des Cervimycin C, wurde auf Grund zu geringer fermentativer Ausbeuten zusätzlich über Hydrolyse dargestellt (Kap. 5.20.3). Chemische Derivatisierung an reaktiven funktionellen Gruppen (OH und CO) ergaben über O-

Methylierung (Kap. 5.20.6) die Cervimycin A- und C-methylester. Die Acetylierung beider Hauptkomponenten ließ zwar in der ESIMS jeweils di- und triacylierte Produkte erkennen, die jedoch auf Grund unzureichender Auftrennung nicht isoliert werden konnten.

3.5 Strukturaufklärung der Cervimycine

Die Strukturen aller Cervimycine wurden mit Hilfe von UV-Vis, IR, MS, ^1H und ^{13}C NMR und zweidimensionaler NMR aufgeklärt. Die 2D NMR Auswertung erfolgte unterstützend mit Hilfe der MesTrec NMR-Software. Die physikochemischen und spektroskopischen Daten und die NMR-Tabellen sind im Anhang zusammengefasst.

3.5.1 Die Hauptkomponenten

3.5.1.1 Cervimycin C (3)

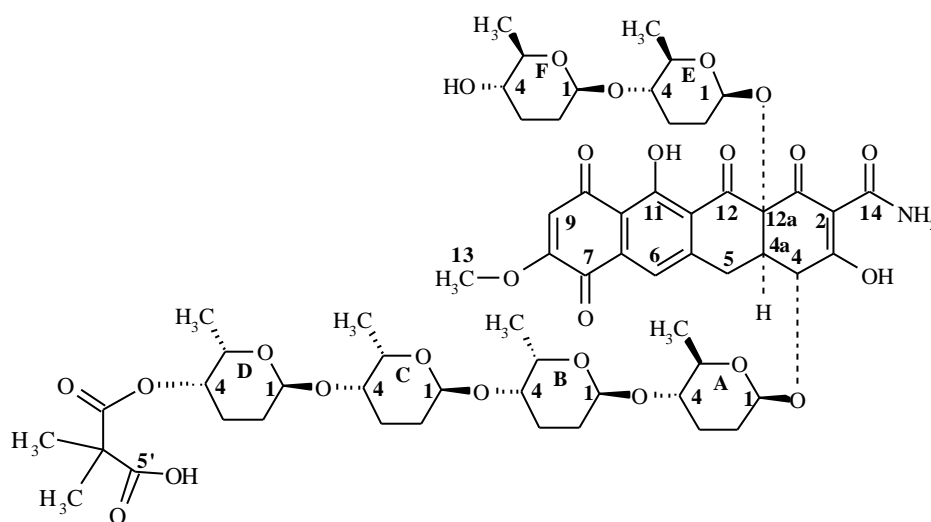


Abb. 6 Struktur von Cervimycin C mit relativer Stereochemie.

Für das orangefarbene Pulver wurde in ESIMS Untersuchungen eine molare Masse von $m/z = 1227$ gefunden, deren ungerade Zahl auf das Vorliegen eines Stickstoffes hinwies. Die Summenformel konnte mittels HRESIMS als $\text{C}_{61}\text{H}_{81}\text{NO}_{25}$ bestimmt werden. ESIMSⁿ Untersuchungen gaben folgende Tochterionen $m/z = 1022 [\text{M} + \text{Na} - 2 \times 114]^+$, $m/z = 680 [\text{M} + \text{Na} - 5 \times 114]^+$, $m/z = 593 [5 \times 114 + \text{Na}]^+$, $m/z = 479 [4 \times 114 + \text{Na}]^+$ und $m/z = 452 [\text{M} + \text{Na} - 7 \times 114]^+$, so dass das Vorliegen u.a. mehrerer 2,3,6-Tridesoxyhexoseeinheiten mit $m/z = 114$ angenommen werden konnte (MSⁿ s. Anhang). Das UV-Vis Spektrum zeigte drei Absorptionsmaxima bei 242 nm, eine Schulter bei etwa 280 nm and 434 nm als Hinweis auf ein konjugiertes aromatisches polycyclisches System mit weitreichender p-Elektronenmesomerie. Unter Zusatz von 1 N NaOH wurde eine batho-

chrome Verschiebung von 434 nm auf 563 nm auf Grund der bereits erwähnten Phenolatbildung (Kap. 3.4.1) beobachtet. Wichtige in der IR aufgetretene Signale korrespondierten mit Valenzschwingungen von aromatischen Doppelbindungen ($1567 / 1593 / 1626 \text{ cm}^{-1}$), Carbonylgruppen (1727 cm^{-1}), aliphatischen Methingruppen ($2854 / 2922 / 2953 \text{ cm}^{-1}$) und Hydroxygruppen (3351 cm^{-1}).

Die NMR Messungen wurden mit verschiedenen deuterierten Lösungsmitteln (Pyridin- d_5 , CDCl_3 und $\text{DMSO-}d_6$) durchgeführt, um alle notwendigen Strukturinformationen zu erhalten. Das ^{13}C NMR in Pyridin- d_5 bestätigte die Existenz von 61 Kohlenstoffen. Die Einbeziehung der DEPT und HSQC Spektren ergab 44 sp^3 -Kohlenstoffe zu 8 Methyl-, 1 Methoxy-, 13 Methylen-, 20 Methingruppen und 2 quaternären Kohlenstoffen und 17 sp^2 -Kohlenstoffe zu 2 Methingruppen und 15 quaternären Kohlenstoffen. Das ^1H NMR Spektrum in Pyridin- d_5 zeigte 78 Signale, davon zwei ins Tieffeld verschobene breite Singulets bei δ 10,23 und δ 10,48, die Hinweise auf nichtäquivalente Protonen einer NH_2 -Gruppe in einer Carbamoylstruktur gaben. Zwei weitere auffällige ^1H Signale erschienen in CDCl_3 als scharfes Singulett bei δ 13,35 und ein breites Singulett bei δ 17,98 sowie δ 12,71 in $\text{DMSO-}d_6$.

Aglykon

Die strukturelle Aufklärung des Grundgerüsts erfolgte durch Kombination von 1D und 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC, ROESY). COSY NMR Daten im Aglykon führten zur Festlegung eines Spinsystems, woraus nur ein kleiner Teil des Grundkörpers ersichtlich war (**Abb. 7**). Die Identifizierung weiterer COSY Kopplungen war auf Grund der limitierten Anzahl an benachbarten Protonen im Aglykon nicht möglich.

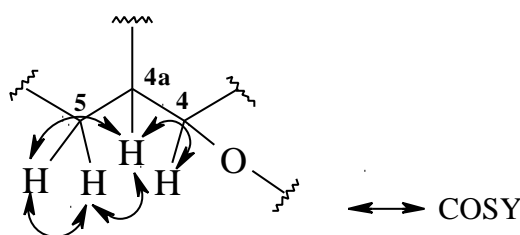


Abb. 7 Einziges COSY Spinsystem im Cervimycin C-Aglykon.

Über hinreichende diagnostische HMBC Kopplungen von H-4, H-4a, beiden H-5, H-6 und H-9 auf die umliegenden Kohlenstoffe (C-4 bis C-12a) unter Berücksichtigung ihrer einzig möglichen Anordnung, gelang schrittweise zunächst die Festlegung der Ringe B, C und D. Unterstützende Informationen lieferten dabei auch die HMBC-Kopplungen ausgehend von

Der Ring D zeigte sich mit den Carbonylkohlenstoffen C-7 (δ 179,11) und C-10 (δ 190,67) als äußeres *p*-chinoides System (**Abb. 8b**). Die direkte Nachbarstellung des Methinkohlenstoffs C-9 (δ 110,50) zu dem methoxysubstituierten C-8 (δ 161,29), basierend auf der weniger intensiven $^2J_{\text{CH-HMBC}}$ Korrelation von H-9 auf C-8 und HMBC Kopplungen zwischen OCH₃-8 und CH-9, konnte bewiesen werden. ROE Kopplungen zwischen den OCH₃-Protonen und H-9 zeigte ihre sterische Nähe an. Die C-H-Kopplungen von H-9 auf die Carbonyle (C-7 und C-10) legte in Konsequenz die Parastellung des Chinons fest. Der Aufbau des aromatischen Ringes C ließ sich zum Teil auf die HMBC Korrelationen von OH-11 (δ 13,35) auf die quaternären C-10a, C-11 und C-11a zurückführen. Ausschlaggebend waren dafür außerdem die Intensitäten der zahlreichen HMBC Kopplungen des H-6. Vier gleichintensive Kopplungen auf C-10a, C-11a, als auch auf C-5 und C-7 rechtfertigten die in

Abb. 8c aufgeführte Konstitution unter der Annahme von $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungen. Die schwächeren HMBC Wechselwirkungen von H-6 auf C-5a und C-6a ließen den Schluss auf $^2J_{\text{CH}}$ -Kopplungen zu und legten ihre unmittelbare Nachbarschaft fest. Gleichzeitig wurden mit den HMBC Korrelationen zwischen H-6 und C-7 bzw. H-6 und C-5 Verknüpfungen zu den angrenzenden Ringen D und B dargelegt. Ein Fragment des Ringes B (**Abb. 8d**) konnte durch die COSY Kopplungen der H-5-Protonen und H-4a definiert werden. Ausgehend von den HMBC Korrelationen dieser Protonen auf die Kohlenstoffe C-5a, C-11a, C-12, C-12a wurde der Ring B vervollständigt. Die Anellierung der Ringe D/C bzw. C/B konnte über die Brückenkohlenstoffe C-6a, C-10a und C-5a und C-11a hergeleitet werden.

Die Interpretation des A-Ringes gestaltete sich auf Grund unzureichender long-range HMBC Wechselwirkungen schwieriger. Die Position von C-4 konnte über COSY Kontakte zwischen H-4 und H-4a und zusätzliche HMBC Korrelationen ausgehend von den beiden Protonen H-5 und dem Proton H-4a auf C-4 bestimmt werden (**Abb. 9a**).

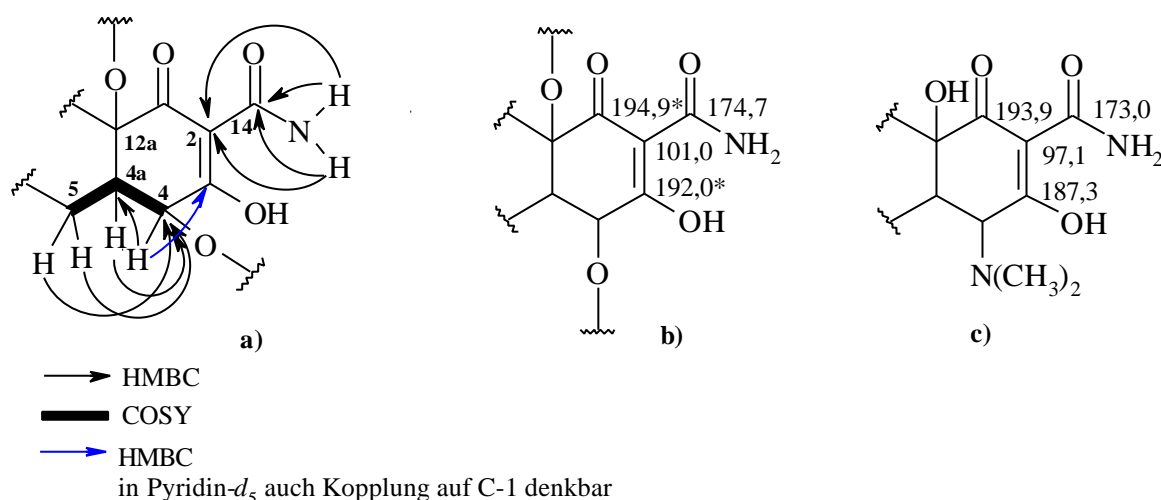


Abb. 9 a: COSY und HMBC Korrelationen im Ring A; vergleichende ^{13}C NMR Shifts von β, β' -Triketonen im Cervimycin C-Aglykon in Pyridin- d_5 (b) und Tetracyclinaglykon in D_2O (c); *Signale austauschbar.

Mit Hilfe der ^{13}C NMR Shifts von δ 194,93, δ 192,03, δ 101,04 und δ 174,74 (Pyridin- d_5) der übrigen relevanten Kohlenstoffe sowie der in CDCl_3 sichtbaren ins Tieffeld verschobenen OH-Gruppe (δ 17,98) gelang die Herleitung des rechten Ring A-Fragmentes (C-1, C-2, C-3 und C-14). Es handelte sich hierbei um ein Enol-Tautomeres eines β, β' -Triketons. Es zeigten sich gute Übereinstimmungen mit anderen in der Literatur beschriebenen β, β' -Triketonen (**Abb. 9b und c**; Asleson et al., 1975). Die $^2J_{\text{CH}}$ -Kopplung von 14-NH $_2$ auf C-14 manifestierte

das Carbonsäureamid, das, identifiziert über die $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungen des 14-NH₂, am C-2 substituiert vorlag (**Abb 9a**).

Vergleiche der 1D NMR Spektren in Pyridin-*d*₅, DMSO-*d*₆ und CDCl₃ zeigten eine typische lösungsmittelabhängige Verschiebung von Tautomeren im Ring A. Während in DMSO-*d*₆ und Pyridin-*d*₅ einfache NMR Signale vorherrschten, waren in CDCl₃ Zweiersets einiger ^{13}C und dazugehöriger ^1H Signale im Aglykon und den angrenzenden Hexosen A und E erkennbar. Damit konnte das Vorliegen eines Keto-Enol-Tautomerengemisches speziell in apolaren Lösungsmitteln (CDCl₃) abgeleitet werden.

Das in Pyridin-*d*₅ vorliegende einzelne Tautomer oder Tautomerenpaar (**Abb. 10.**), dessen Umwandlung nicht von der NMR Zeitskala erfasst wird, konnte nicht beschrieben werden, da erwartungsgemäß das Enol-OH Signal und zugehörige Kopplungen ausblieben, und die Zuweisung der Kohlenstoffe (δ 194,93) und (δ 192,03) zu Position C-1 und C-3 nicht möglich war. Die gemessene HMBC long-range Kopplung von H-4 auf das Kohlenstoff δ 194,93 konnte dessen genaue Positionierung in C-1 oder C-3 nicht festlegen, da es sich um eine $^2J_{\text{CH}}$ - oder $^4J_{\text{CH}}$ -Kopplung handeln konnte (**Abb. 9a**). Die fehlenden Enol-OH HMBC Kopplungen ließen auch in DMSO-*d*₆ keine Schlussfolgerungen zu. Für die in Pyridin-*d*₅ und DMSO-*d*₆ gemessenen NMR Spektren wurden die Signale C-1 und C-3 in den NMR Tabellen, wie üblich gehandhabt, als austauschbar angegeben.

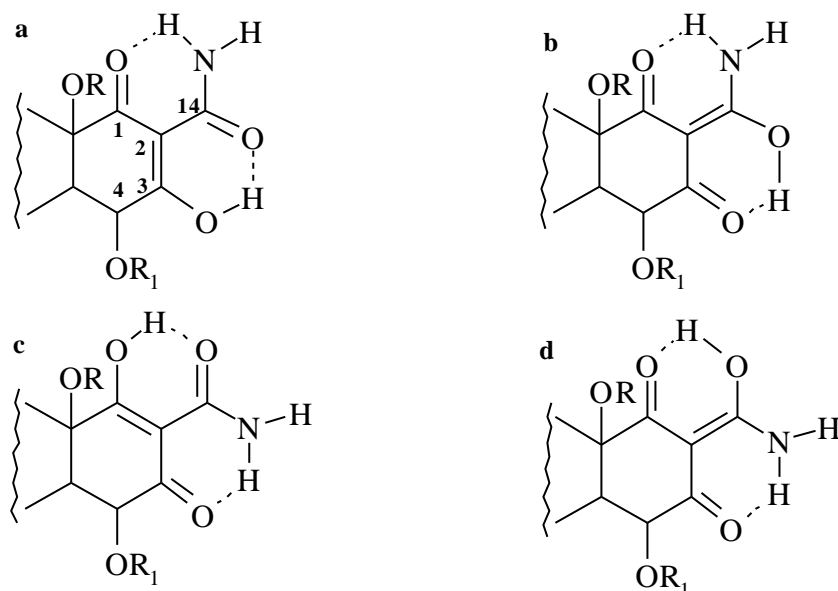


Abb. 10 Mögliche Tautomerie im Ring A.

Für eine plausible Interpretation des im Verhältnis 1:1,5 vorliegenden Tautomerengemisches in CDCl_3 wurden wichtige NMR Daten des höheranteiligen Tautomers betrachtet.

Das stärker tieffeldverschobene Kohlenstoff (δ 193,91) nahm eindeutig die Position C-3 ein, dem die ^{13}C -Kopplung zwischen C-3 und C-4 in einem in CDCl_3 vermessenen INADEQUATE Spektrum (s. Kap. 3.9.1) zu Grunde lag. Somit wurde für das Kohlenstoff mit δ 190,38 die Position C-1 eingeräumt, wie in **Abb. 11** dargestellt. Zur weiteren Betrachtung konnte das HMBC Spektrum (in CDCl_3) des Cervimycin C-Methylesters herangezogen werden, da nur dieses COSY und HMBC Wechselwirkungen des Enol-OH auf umliegende Kohlenstoffe (C-2, C-3, C-4, C-14) im dominanten Tautomer aufwies.

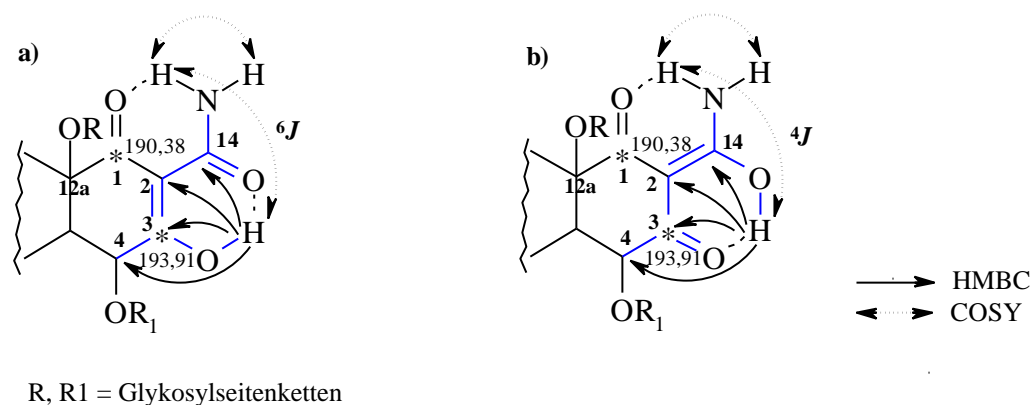


Abb. 11 Postulate (a, b) des dominanten Tautomer im Ring A von Cervimycin C in CDCl_3 an Hand von COSY und HMBC Korrelationen im Cervimycin C-Methylester.

Die sichtbaren OH-HMBC Wechselwirkungen ließen sich gut mit dem Tautomer **a** (**Abb. 11a**) vereinbaren, jedoch erschien die vorhandene H-H COSY Kopplung des Enol-H auf das in eine Wasserstoffbrücke eingebundene Amidproton als 6J -Korrelation unwahrscheinlich, es sei denn, dass die Enol-Wasserstoffbrücke eine solche Kopplung über den Carbamoylsauerstoff auf Grund des delokalisierten Systems zuließ. Dies würde auch erklären, dass die COSY Kopplung zum zweiten Amidproton nicht zu sehen war.

Tautomer **b** (**Abb. 11b**) erschien für das dominante Tautomer ebenfalls wahrscheinlich, insbesondere auf der Basis der denkbaren $^4J_{\text{H,H}}$ COSY Korrelation zwischen dem OH und dem einen Amidproton. Die starke Tieffeldverschiebung von C-1 und C-3 sprachen für zwei Carbonylkohlenstoffe und die geringfügige Differenz der Shifts von C-1 (δ 190,38 zu 192,77) und C-3 (δ 193,91 zu 193,34) der in CDCl_3 vorliegenden Tautomere unterstützte die α -o-Enol-Theorie im möglichen Übergang von Tautomer **b** zu **d** (**Abb. 10**). Ob diese Tautomere jedoch energetisch stabil sind, konnte an dieser Stelle nicht bewiesen werden.

Stereochemie des Aglykons

Hierfür war geplant, die Substanz zu kristallisieren, um die relative Stereochemie im Aglykon über Röntgenstrukturaufklärung abzuleiten. Kristallisationsversuche in polaren, unpolaren oder gemischten Lösungsmitteln erbrachten nicht den gewünschten Erfolg. Kristalle in Form feiner Nadeln in wässrigem MeOH erwiesen sich für die Röntgenstruktur als ungeeignet. Der hohe Saccharidanteil in der Struktur könnte ein Grund für die erschwerte Kristallisation sein, wobei gleiche Versuche mit dem Aglykon ebenfalls erfolglos blieben.

Daraufhin wurde versucht, durch Erstellung der energieminierten Konformation mit Hilfe der ACD/3D- bzw. Chem-3D-Computerkalkulationsprogramme Rückschlüsse auf die geometrische Anordnung zu ziehen. Dabei traten erhebliche Unterschiede in den Berechnungen der einzelnen Programme auf, die in beiden Fällen auch wenig Übereinstimmungen mit den in der NMR erhaltenen Daten aufwiesen.

Einige geometrische Zusammenhänge wurden mit Hilfe von wichtigen NMR Korrelationen im Vergleich mit Literaturangaben verwandter Substanzen abgeleitet oder postuliert.

Die relative Geometrie der Protonen H-4 und H-4a konnte an Hand der vicinalen Kopplungskonstanten von $^3J_{4,4a} = 11,8$ Hz in Ableitung der Karplus-Gleichung (Friebolin, 1992) als *trans*-diaxiale Stellung (**Abb. 12a, b**) bestimmt werden, wie es u.a. für Oxytetracyclinderivate beschrieben wurde (Schach v. Wittenau et al., 1966). Andere Autoren schlussfolgerten ebenfalls *trans*-diaxiale Konformation auf Grund einer großen Kopplungskonstanten (9-11 Hz) und bestätigten mittels Röntgenstrukturanalyse einen großen Dihedralwinkel zwischen H-4 und H-4a von $169,8^\circ$ (von Dreele et al., 1971) und $179,7^\circ$ (Kunnari et al., 2002). Fehlende ROE Kontakte zwischen H-4 und H-4a in Cervimycin C untermauerten diese Erkenntnis.

Die räumliche Anordnung von H-5 (δ 3,93) zu H-4a konnte mit $^3J_{4a,5} < 1$ in einem Winkel um 90° erklärt werden. Von Dreele et al. fanden $85,5^\circ$ für 5, 12a-Diacetyloxytetracyclin. Das zweite H-5 (δ 4,33) des Cervimycin C ließ mit der größeren Kopplungskonstante $^3J_{4a,5} = 5,3$ eine stärkere räumliche Annäherung zu H-4a mit einem kleineren Dihedralwinkel vermuten. ROE Wechselwirkungen in **3** waren zwischen H-4a und beiden inäquivalenten H-5 mit vergleichbarer Intensität zu erkennen.

Die relative Stereochemie von H-4a, OR-12a und OR₁-4 in **3** war weniger einfach abzuleiten. Kunnari et al. (2002) implizierten zunächst eine *syn*-Stellung von H-4a und OH-12a auf Grund der relativen Unempfindlichkeit ihres Aglykons gegen chemische Dehydratisierung

(und in Konsequenz Aromatisierung) unter EIMS-Bedingungen. Gleiche Schlussfolgerungen waren für das Aglykon **6** nicht möglich. Jedoch wies der ROE Kontakt zwischen dem H-4a und dem H-1E der in C-12a substituierten Seitenkette in **3** (Abb. 12a) und die im Aglykon **6** (Abb. 12b) identifizierten ROE Kopplungen zwischen OH-4, H-4a und OH-12a auf eine *syn*-Stellung der drei Substituenten hin.

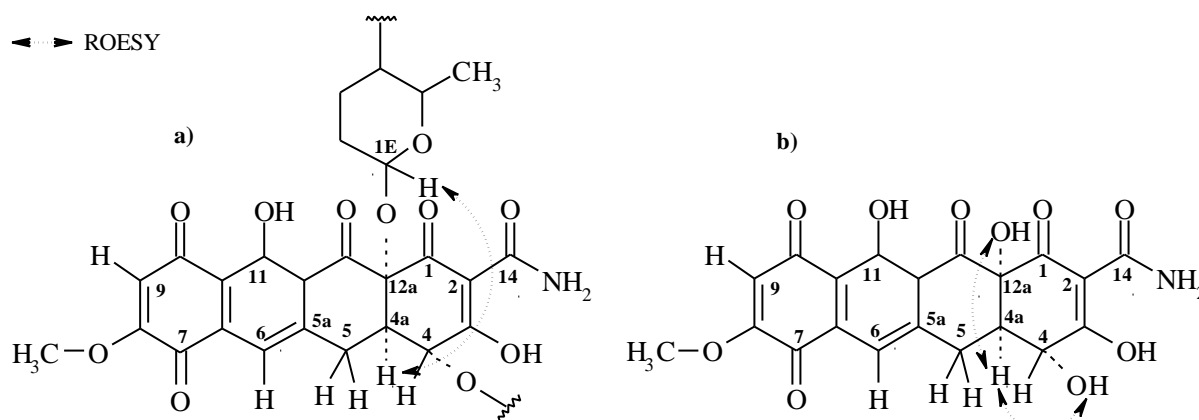


Abb. 12 Nachweis der *syn*-Stellung der Substituenten in C-4, C-4a und C-12a durch ROESY Korrelationen zwischen H-1E und H-4a in Cervimycin C (a) und zwischen OH-12a, OH-4 und H-4a im Aglykon (b); *trans*-diaxial-Stellung von H-4 und H-4a ersichtlich.

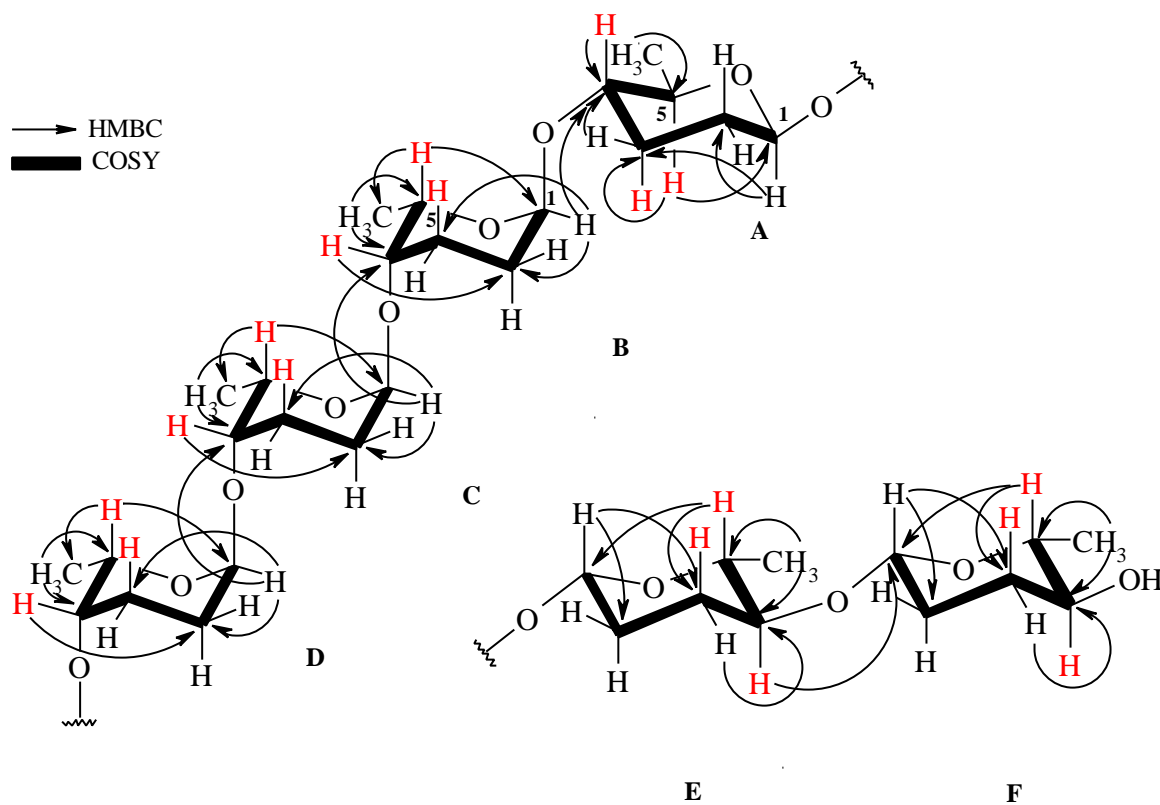
Es sei erwähnt, dass die Klärung der absoluten Stereochemie in den drei chiralen Zentren des Aglykons (C-4, C-4a und C-12a) nicht möglich war.

Glykosidseitenketten und ihre Stereochemie

Die Struktur und die Stereochemie der Seitenketten konnte an Hand von 1D und 2D NMR Daten festgelegt werden. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration der Monosaccharideinheiten wurde Cervimycin C (**3**) total hydrolysiert, die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Monosaccharide dargestellt und die Drehwerte im Vergleich zur Literatur zur Identifikation herangezogen (Kap. 5.20.4; 5.20.5; 5.18).

Die 1D NMR Daten von **3** bewiesen die Präsenz von 6 Methingruppen bei 99-104 ppm, 6 Methylgruppen bei 17-19 ppm, 12 Methylengruppen bei 22-32 ppm und 12 Methingruppen bei 65-80 ppm und somit die Existenz von sechs konstitutionell gleichen 2,3,6-Tridesoxyhexosen (2,5-Dihydroxy-6-methyl-pyrane), was die Massefragmente ($M = 114$) in der ESIMSⁿ und somit die frühere Vermutung bestätigte. Die Zuweisung der sechs in einem Monosaccharid enthaltenen Kohlenstoffe wurde durch H-H COSY Kopplungen der Protonen aller benachbarter C-Atome gewährleistet. Wichtige long-range HMBC Korrelationen unterstützten diese Ergebnisse. Insbesondere der Ringschluss konnte jeweils durch die

$^3J_{\text{CH}}$ Kopplung der H-5A;B;C;D;E;F-Position auf das entsprechende C-1A;B;C;D;E;F bestätigt werden. Diese Zusammenhänge sind in **Abb. 13** dargestellt.



H = typische Stellungen der Protonen in C-3, C-4 und C-5 aufgrund der ^1H Kopplungskonstanten

Abb. 13 COSY und HMBC Korrelationen in den Hexosen A, B, C, D, E, F.

Die anomeren Protonen (H-1B, H-1C und H-1D) der Pyranosen B, C und D zeigten im ^1H NMR jeweils mit kleinen Kopplungskonstanten von $^3J_{1,2\text{B}; 1,2\text{C}; 1,2\text{D}} < 1\text{ Hz}$ α -Konfiguration, während A, E und F mit $^3J_{1,2\text{A}} = 9,1\text{ Hz}$, $^3J_{1,2\text{E}} = 8,6\text{ Hz}$ und $^3J_{1,2\text{F}} = 9,4\text{ Hz}$ eindeutig β -Konfiguration aufwiesen. Die H-1 Konfigurationen der Monosaccharide A und F konnten hierfür nur in CDCl_3 bestimmt werden. Zur Identifikation der Stereochemie in C-4 und C-5 wurden ebenfalls die ^1H Kopplungskonstanten herangezogen. Die H-5 in B, C und D waren auf Grund der angrenzenden 6- CH_3 -Gruppe als Quartetts aufgespalten und zeigten eine sehr kleine Kopplungskonstante ($^3J < 1$) zwischen H-4 und H-5 und somit eine äquatorial (H-4) – axial (H-5)-Stellung. Für die Monosaccharide B, C und D konnte α -Rhodinose, in der diese Orientierung vorkommt, gefunden werden. Die Pyranose E, deren H-5 ein Quartett-Dublett aufwies, zeigte mit $^3J_{4,5} = 6,1\text{ Hz}$ hingegen axial (H-4) – axial (H-5)-Anordnung und wurde als β -Amicetose festgelegt. Die Bestimmung der Hexosen A und F erfolgte auf Grund überlagerter Resonanzen nicht über die jeweiligen H-5 Protonen, sondern der Auswertung der

H-4 Protonen. Diese lagen als stark aufgesplante Multipletts vor, wie sie auf Grund der *trans*-Stellung der H-4 und H5 bzw. H-3 und H-4 nur in der Amicetose zu finden sind. H-4 der Rhodiose zeigt hingegen breite unaufgesplante Singulets. Somit wurden die Monosaccharide A und F ebenfalls als β -Amicetose identifiziert. Das Vorliegen der β -Amicetose und α -Rhodiose in den entsprechenden Positionen wurde zusätzlich durch sichtbare H-HROE Korrelationen der koppelnden Protonen, die für jede Hexose bestimmt werden konnten, untermauert (**Abb. 14**). Vor allem die H-H Korrelationen zwischen den axial-stndigen, auf einer Seite liegenden H-2 und H-4, H-1 und H-3 sowie H-1 und H-5, als auch die nichtvorhandene Kopplung zwischen H-4 und H-5 (*trans*-Stellung) waren ein typisches Indiz für die β -Amicetosen A, E und F (**Abb. 14b**). Demgegenüber wurde in den α -Rhodiosen (B, C, D) nur die H-H Kopplung zwischen den axial-stndigen H-3 und H-5 diagnostiziert, und es konnte in allen Fällen eine schwache H-H ROE Wechselwirkung zwischen dem quatorial-stndigen H-4 und dem axial-stndigen H-5 gefunden werden (**Abb. 14a**).

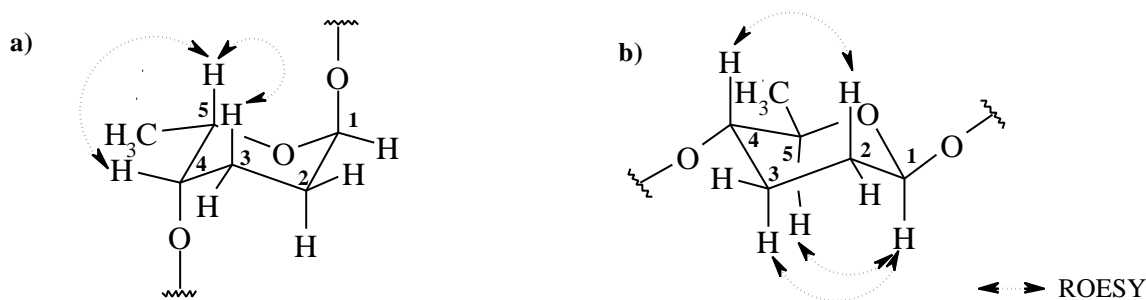


Abb. 14 ROESY Korrelationen von a: α -Rhodiosen B, C, D und b: β -Amicetosen A, E und F.

Cervimycin C wurde über Totalhydrolyse abgebaut und das daraus hervorgegangene farblose Reaktionsgemisch der einzelnen Pyranosen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu den 2,4-Dinitrophenylhydrazonen umgesetzt (Kap.5.20.4; 5.20.5). Zwei Hydrazone mit der erwarteten Masse von $m/z=312$ konnten letztendlich mittels semipräparativer RP-HPLC getrennt werden (Kap. 5.16.3). Drehwertmessungen ergaben $[\alpha]^{22}_D = -10,7^\circ$ (c 0,15, Pyridin) des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der D-Amicetose und $[\alpha]^{22}_D = -21,4^\circ$ (c 0,14, Pyridin) des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der L-Rhodiose im Vergleich mit der Standardliteratur (Stevens et al., 1964 mit $[\alpha]^{25}_D = -10,0^\circ$ (c 0,9, Pyridin), $[\alpha]^{25}_D = -14,9^\circ$ (c 0,5, Pyridin). Haines, A.H. (1972) fand für die L-Rhodiose einen $[\alpha]$ -Wert von $-17,7^\circ$ (c 0,6, Pyridin).

Somit war die vollständige Aufklärung der Hexoseeinheiten A, E und F zu β -D-Amicetose (β -2,3,6-Tridesoxy-*erythro*-hexopyranose) und B, C und D zu α -L-Rhodinose (α -2,3,6-Trides-oxy-*threo*-hexopyranose) möglich.

HMBC long-range Korrelationen zwischen H-4 und H-1 der verknüpften Pyranosen ließen $1 \rightarrow 4$ -O-glykosidische Bindungen erkennen (**Abb. 13**). Die O-glykosidische Substitution der Seitenketten am Aglykon wurde über J_{CH} -Kontakte des H-1E auf C-12a und H-4 auf C-1A beobachtet (**Abb. 15b, c**). Die HMBC Korrelation von H-4D auf das Carbonylkohlenstoff C-1' bewies die Veresterung der endständigen Pyranose D mit einer Carbonsäure. Die Existenz der beiden diastereotopen Methyl-Kohlenstoffe CH_3 -3' und CH_3 -4', deren Protonen über HMBC Kontakte die Verknüpfung mit dem quaternären C-2' (**Abb. 15a**) und den zwei Kohlenstoffen der Säuregruppen (C-1' δ 173,45; C-5' δ 175,54) anzeigten, führte zur Identifikation der Dimethylmalonsäure. Diese ist als substituierter Monoester bisher einzigartig in Naturstoffen.

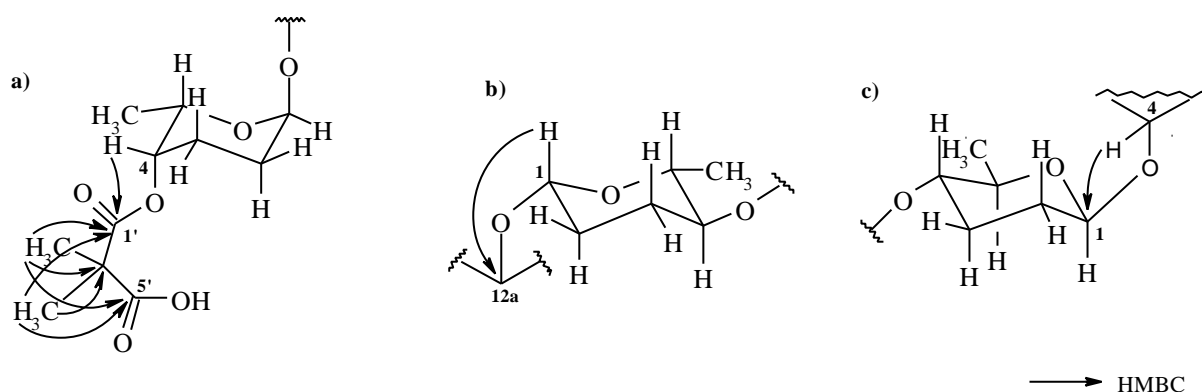


Abb.15 HMBC Korrelationen von a: Hexose D auf den Dimethylmalonsäurester (DMMSE) und innerhalb des DMMSE; b: Hexose E auf das Aglykon; c: Hexose A auf das Aglykon.

3.5.1.2 Cervimycin A (1)

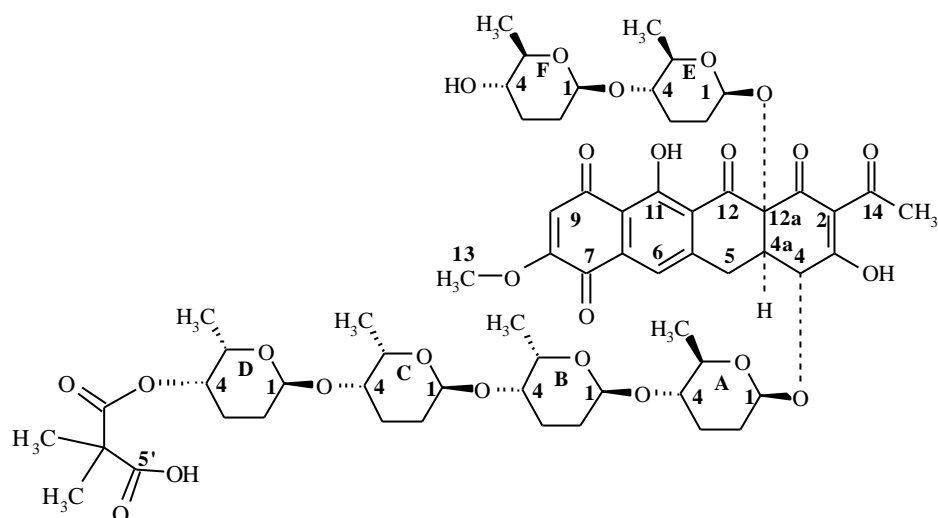


Abb. 16 Struktur von Cervimycin A mit relativer Stereochemie.

Die physikochemischen Eigenschaften des Cervimycin A waren ähnlich denen des Cervimycin C. Die Absorptionsmaxima im UV-Vis Spektrum lagen bei 240 nm, 277 nm, und 434 nm, wobei das zweite Maximum nicht als Schulter, sondern echte Bande erkennbar war. Das vergleichbare spektroskopische Verhalten im UV-Vis nach Basenzugabe ließ auf chromophore Gemeinsamkeiten schließen. Die Aufnahme der CD Spektren (Abb. 17) beider

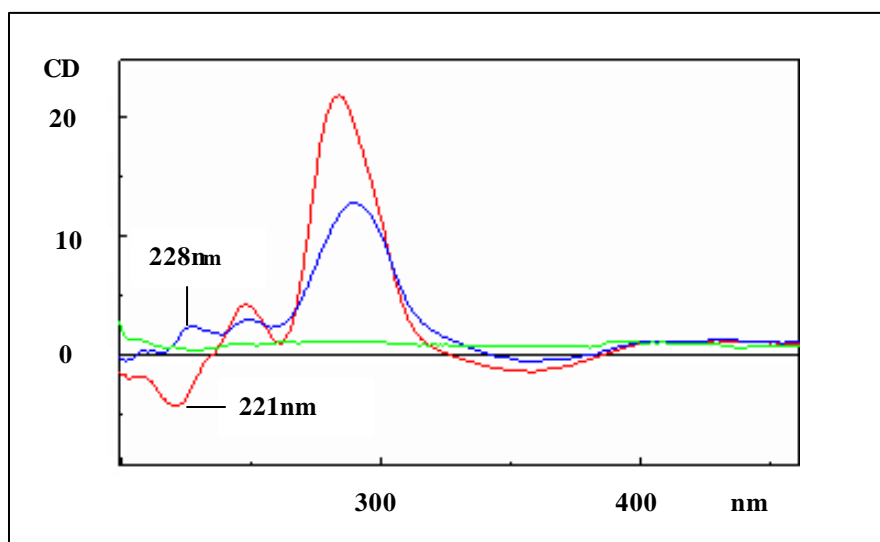


Abb. 17 CD-Spektren des Cervimycin A (blau) und Cervimycin C (rot), vermessen in Pyridin.

Cervimycine bewiesen annähernde Übereinstimmungen in 290 nm und 250 nm von **1** und 284 nm und 248 nm von **3** mit positiven Cotton-Effekt und verwiesen auf gleiche stereochemische Zusammenhänge. Aber auch ein konträrer Cotton-Effekt bei 221 nm für **3** und 228 nm für **1** konnte identifiziert werden, dessen Bewertung ohne entsprechende stereochemisch bekannte Vergleichssubstanzen schwierig ist.

Die Bestimmung der Masse von $m/z = 1226$ von **1** zeigte eine Massendifferenz von $m/z = 1$ zu **3**, was durch die im ESIMSⁿ erhaltenen Tochterionen $m/z = 1021 [M + Na - 2 \times 114]^+$, $m/z = 679 [M + Na - 5 \times 114]^+$ und $m/z = 451 [M + Na - 7 \times 114]^+$ Bestätigung fand und zusätzlich durch die Äquivalenz der Tochterionen in der langen Seitenkette $m/z = 593 [5 \times 114 + Na]^+$, $m/z = 479 [4 \times 114 + Na]^+$ von **1** und **3** die strukturelle Veränderung innerhalb des Aglykons schlussfolgern ließ (s. MSⁿ im Anhang). In der Summenformel C₆₂H₈₂O₂₅ wurde im Vergleich zu **3** der Verlust des Stickstoffatoms im Austausch mit einem Kohlenstoff und einem Proton ersichtlich.

Die Auswertung der ¹³C und ¹H NMR Spektren, die ebenfalls in CDCl₃, Pyridin-*d*₅ und DMSO-*d*₆ aufgenommen wurden, zeigten eine zusätzliche stark ins Tieffeld verschobene Methylgruppe (C-15, δ 29.03) und wiesen deutliche Veränderungen der Shifts in C-2 und C-14 des Aglykons auf. Außerdem konnten für **1** keine Stickstoffprotonen identifiziert werden. Alle übrigen 1D NMR Daten waren mit denen von **3** identisch. Die Struktur des Cervimycin A konnte durch Ersatz des Carbonsäureamids durch eine Acetylgruppe in C-2 realisiert werden.

Aglykon

Vergleiche mit in der Literatur beschriebenen Substanzen mit einem Acetylrest in C-2 des Ringes A ließen eindeutige Annäherungen der ¹³C Verschiebungen in C-1, C-2, C-3, C-14 und C-15 erkennen. Sie sind nachfolgend in **Tab. 2** aufgeführt.

Tab.2 Vergleich ausgewählter ¹³C NMR Shifts im A-Ring von Cervimycin A und strukturverwandter Substanzen.

¹³ C	Cervimycin A (δ ppm) Pyridin- <i>d</i> ₅	Polyketomycin ¹ (δ ppm) CDCl ₃	Dutomycin ² (δ ppm) DMSO- <i>d</i> ₆	BMS-192548 ³ (δ ppm) DMSO- <i>d</i> ₆
C-1	193,58*	192,40*	195,25*	194,1*
C-2	113,83	110,54	110,50	112,4
C-3	190,79*	195,66*	190,06*	192,6*
C-14	202,77	201,09	200,04	196,7
C-15	29,03	26,68	26,5	31,2

* C-1 und C-3 kann auf Grund unterschiedlicher Lösungsmittel-abhängiger Tautomerie vertauscht sein;

¹ Momose, W. C. et al., 1998^a; ² Xuan, L. et al., 1992; ³ Shu, Y. et al., 1995.

HMBC Kopplungen von CH₃-15 auf C-14 bestätigten die Acetylgruppe. Die COSY und übrigen HMBC Daten waren im Einklang mit denen von **3** und diagnostizierten den gleichen Aufbau in den Ringen B, C und D (**Abb. 18**).

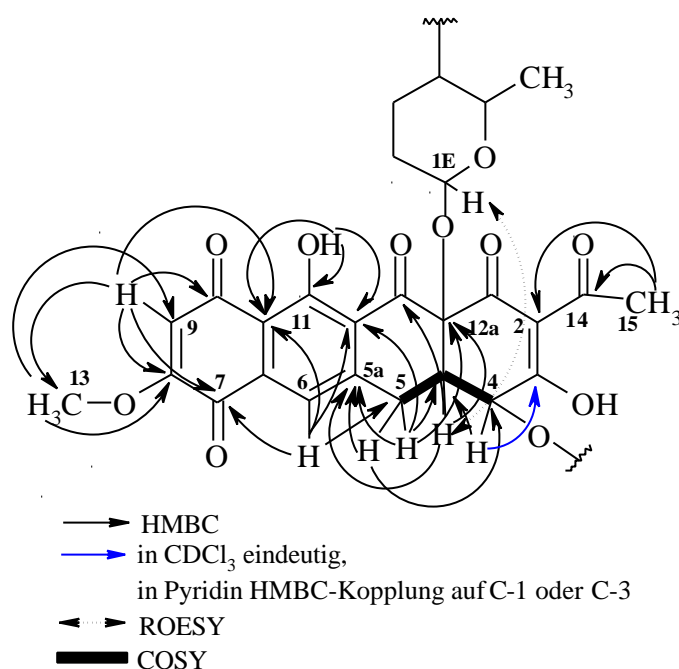


Abb. 18 COSY, HMBC und ROE Korrelationen im Cervimycin A-Aglykon.

Stereochemie im Aglykon

Die stereochemischen Zusammenhänge konnten in Übereinstimmung zu **3** festgestellt werden. Es wurde auch für **1** eine *trans*-diaxiale Stellung der Protonen in C-4- und C-4a ($^3J_{4,4a} = 11,8$ Hz) bestimmt und durch den fehlenden ROE Kontakt zwischen beiden Protonen zusätzlich belegt. Auch die H-5 (δ 3,90, $^3J_{4a,5} < 1$) - bzw. H-5 (δ 5,33, $^3J_{4a,5} = 5,3$) - H-4a Stellungen konnten analog zu **3** geschlussfolgert werden.

Der ROE Kontakt zwischen dem H-4a und dem H-1E der in C-12a sitzenden Seitenkette war ebenfalls zu erkennen (**Abb. 18**).

Glykosidseitenketten und ihre Stereochemie

1D, COSY und HMBC NMR bewiesen die identische Konstitution der sechs 2,3,6-Tridesoxyhexosen. Die Herleitung der Konfigurationen im anomeren C-1 und in C-5 der Hexosen konnte in Analogie zu **3** in Betrachtung der Kopplungskonstanten erfolgen, deren Festlegung wiederum durch korrelierende H-H ROE Daten gestützt wurden (s. auch **Abb. 14**). Die Ergebnisse verwiesen wieder auf β -D-Amicetose (β -2,3,6-Tridesoxy-*erythro*-hexopyranose) in den Hexosen A, E und F und α -L-Rhodinose (α -2,3,6-Tridesoxy-*threo*-hexopyranose) in

B, C und D. Auf die Drehwertmessung der modifizierten Hexosen wurde hier verzichtet. Vollständig identische spektroskopische Zusammenhänge (NMR Daten) der Pyranosen von **1** und **3** ließen auch auf eine Übereinstimmung der absoluten Konfiguration der Hexosen beider Substanzen schließen.

Der Beweis für das Vorliegen der Dimethylmalonsäure, verestert in Stellung C-4 der Hexose D konnte gleichfalls über NMR Daten erbracht werden (s. auch NMR **Tab. 12** im Anhang).

3.5.2 Die homologen Cervimycine

Nach der Isolierung und Strukturaufklärung aller Verbindungen war sehr bald ersichtlich, dass es sich um Substanzen einer Strukturklasse handelte. Ihre strukturelle Katalogisierung erfolgte in zwei Hauptgruppen an Hand der Aglyka, die sich im C-2 durch einen Carbamoyl- bzw. Acetylrest entsprechend den Hauptkomponenten Cervimycin A (**1**) und C (**3**) unterschieden. Sie wurden somit entweder der Gruppe A (Acetyl) bzw. C (Carbamoyl) zugeordnet. Die Aglyka und, soweit vorhanden, Substituenten in den Seitenketten der nachfolgenden Cervimycine konnten in Konstitution und Stereochemie zu **1** und **3** identisch abgeleitet werden. Daher werden nur ihre strukturellen Abweichungen beschrieben.

3.5.2.1 Cervimycin B (**2**) und D (**4**)

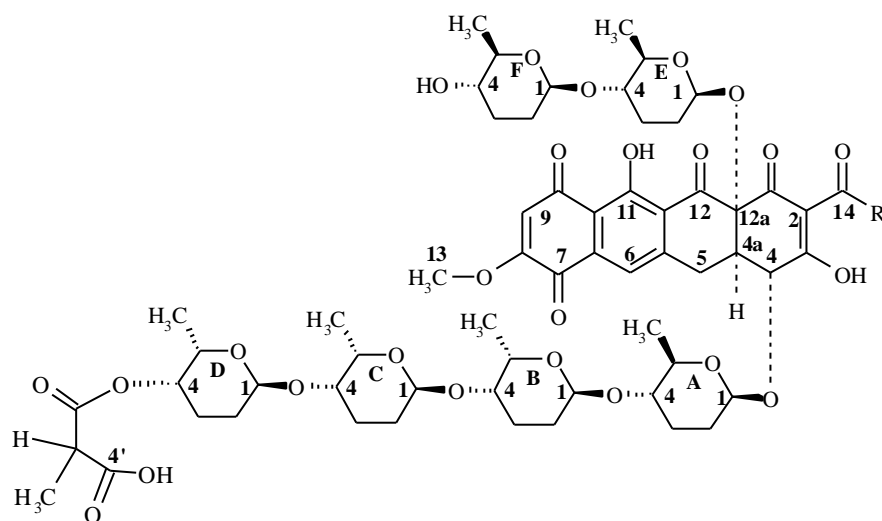


Abb. 19 Struktur von Cervimycin B ($R = \text{CH}_3$) und D ($R = \text{NH}_2$) mit relativer Stereochemie.

Das Cervimycin B (**2**) konnte der Gruppe A und D (**4**) der Gruppe C zugeordnet werden. Die molaren Massen von $m/z = 1212$ (**2**) und $m/z = 1213$ (**4**) verwiesen auf das Fehlen einer Methylgruppe gegenüber **1** und **3**.

Bei beiden Substanzen wurde der Verlust der Methylgruppe im 1D NMR und DEPT beobachtet. Die Tochterionen im ESIMSⁿ im Bereich des Aglykon von **2** und **4** waren identisch zu denen von **1** und **3**. Jedoch zeigte eine Massedifferenz von $m/z = 14$ der Tochterionen in der längeren Seitenkette für **2** und **4** im Vergleich zu **1** und **3** die lokale Veränderung an (**Tab. 3**; MSⁿ im Anhang).

Tab.3 Tochterionen von Cervimycin B und D im Vergleich zu Cervimycin A und C im Aglykonbereich und der längeren Seitenkette.

	Cervimycin A	Cervimycin B	Cervimycin C	Cervimycin D
Aglykonbereich	m/z = 679 m/z = 451		m/z = 680 m/z = 452	
Seitenkette	m/z = 593 m/z = 479	m/z = 579 m/z = 465	m/z = 593 m/z = 479	m/z = 579 m/z = 465

Das quaternäre C-2' der Dimethylmalonsäure [δ 50,62 (**1**) und δ 50,71 (**3**)] war jeweils durch eine ins Hochfeld verschobene CH-Gruppe [δ 46,74 (**2**) und δ 47,23 (**4**)] ersetzt. Das als Quartett aufgespaltene korrelierende Proton (H-2') bewies die Nachbarstellung der Methylgruppe C-3'. HMBC Kopplungen der identischen Protonen in C-3' und des H-2' auf die beiden C-1' und C-4' Carbonyl-Kohlenstoffe [C-1', δ 170,56 und C-4', δ 172,42 (**2**) bzw. C-1', δ 171,07 und C-4', δ 172,90 (**4**)] diagnostizierten die Monomethylmalonsäure (**Abb. 20**). Diese war ebenfalls, sichtbar durch die C-H Korrelation von H-4D auf C-1', endständig mit der langen Seitenkette verestert. Somit wurden **2** und **4** als die jeweiligen Monomethylmalonsäureester beider Hauptgruppen identifiziert

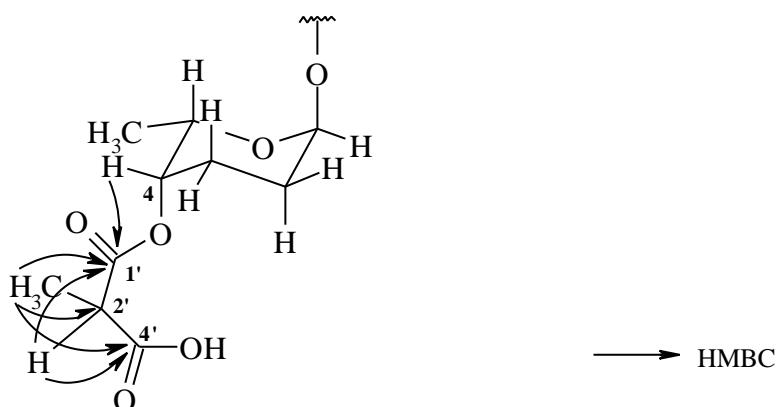


Abb. 20 HMBC Korrelationen im Monomethylmalonsäureester (MMMSE) und HMBC Kopplung von Hexose D auf den MMMSE.

Eine Besonderheit der in Pridin- d_5 aufgenommenen NMR Spektren für **2** und **4** war das Auftreten von doppelten ^{13}C und ^1H Signalen (1:1) aller Shifts innerhalb der Monomethylmalonsäure und den Kohlenstoffen C-4D, C-5D und C-6D und der dazugehörigen Protonen der Pyranose D (s. NMR **Tab. 13** und **Tab. 15** im Anhang). Dies deutete auf das Vorliegen eines nicht trennbaren Diastereomerenpaares hin, welches sich durch Substitution von R- oder S-Monomethylmalonsäure unterschied. Diese Schlussfolgerung soll später eingehender diskutiert werden.

3.5.2.2 Cervimycin A- und Cervimycin C-methylester (14 und 15)

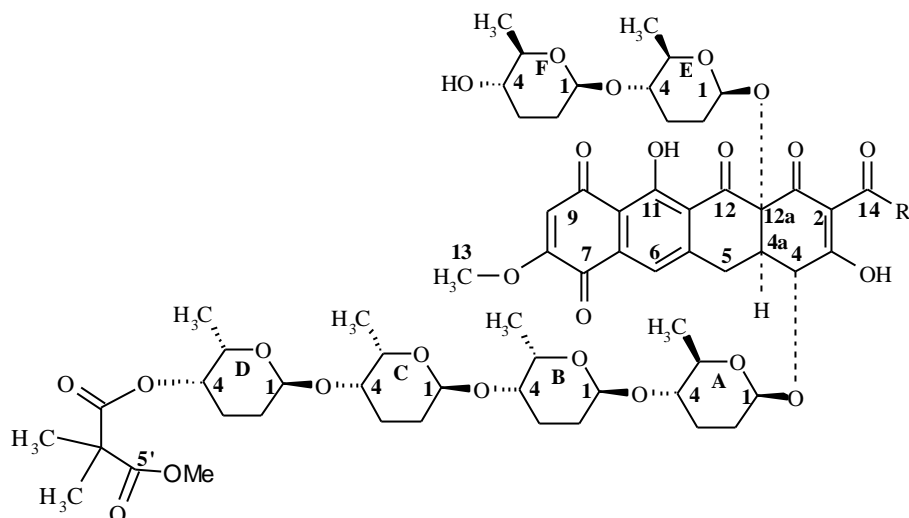


Abb. 21 Strukturen des Cervimycin A- ($R = CH_3$) und Cervimycin C-methylesters ($R = NH_2$) mit relativer Stereochemie.

Die molaren Massen beider jeweils aus dem chemischen Ansatz (Kap. 5.20.6; 5.20.7) isolierter Substanzen mit $m/z = 1240$ (**14**) und 1241 (**15**) bestätigten die Methylierung der Hauptkomponenten. Die ^{13}C und 1H NMR Spektren zeigten eine zusätzliche Methoxygruppe bei δ 52,39 (**14**) und δ 52,36 (**15**) mit den für diese Gruppe typischen tieffeldverschobenen Protonen bei δ 3,70 (**14** und **15**). Die HMBC Kopplung der drei identischen H-6' auf C-5' bewies den Methylester der Dimethylmalonsäure. Somit fand in beiden Gruppen eine bevorzugte O-Methylierung der Dicarbonsäure statt (**Abb. 22**).

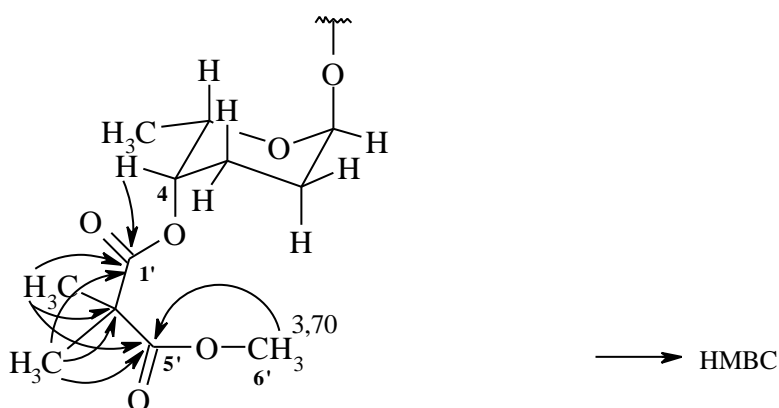


Abb. 22 HMBC Korrelationen im Dimethylmalonsäurediester (DMMSDE) und HMBC Kopplung von Hexose D auf den DMMSDE.

3.5.2.3 Cervimycin K (11)

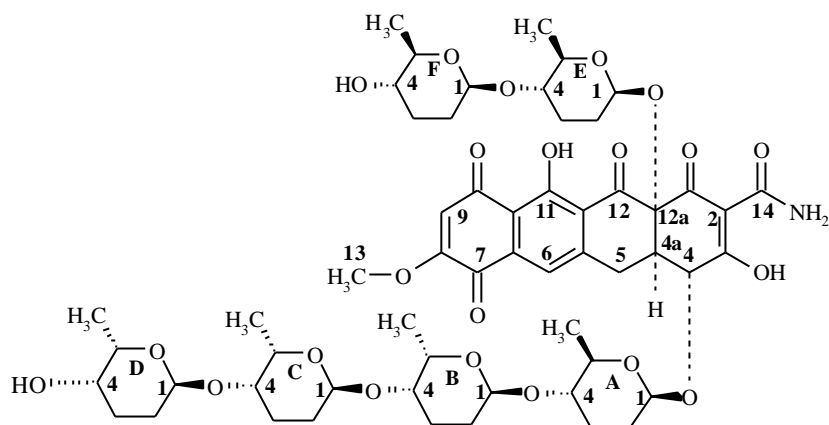


Abb. 23 Struktur von Cervimycin K mit relativer Stereochemie.

Für das in die Gruppe C eingeordnete Cervimycin K konnte mit Hilfe der ESIMS eine molare Masse von $m/z = 1113$ bestimmt werden.

Während die 1D NMR und 2D NMR Daten der sechs Monosaccharide komplett vorhanden waren, fehlten alle ^{13}C und ^1H NMR Resonanzen der endständigen Dicarbonsäuren (Mono- oder Dimethylmalonsäure), deren Verlust mit der Massendifferenz $m/z = 114$ zu **3** bzw. $m/z = 100$ zu **4** korrelierte. Das C-4 D zeigte eine leichte Hochfeldverschiebung von ca.-3 ppm gegenüber der veresterten Form (**3**).

3.5.2.4 Cervimycin J (10) und L (12)

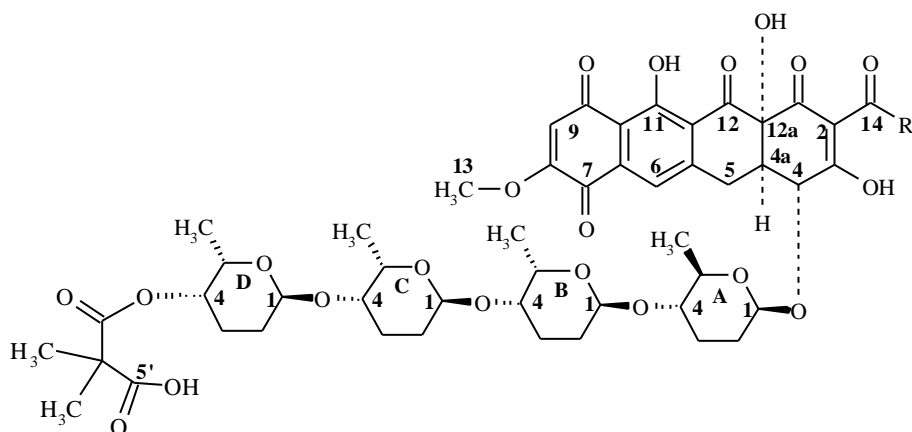


Abb. 24 Strukturen der Cervimycine J ($\text{R} = \text{NH}_2$) und L ($\text{R} = \text{CH}_3$) mit relativer Stereochemie.

Die molaren Massen von **12** mit $m/z = 998$ der Gruppe A und **10** mit $m/z = 999$ der Gruppe C im Vergleich zu **1** und **3** zeigten eine Differenz von $m/z = 228$.

Die Summenformeln von $C_{50}H_{62}O_{21}$ für **12** und $C_{49}H_{61}NO_{21}$ für **10** ergaben mit einem Verlust von 12 C, 4 O und 20 H im Vergleich zu den Hauptkomponenten das Fehlen eines Disaccharids und nicht, wie ebenfalls für $m/z=228$ möglich, die Abspaltung der Dimethylmalonsäure und einer Hexose. Dies wurde durch die fehlenden ^{13}C und 1H NMR Shifts der beiden Hexosen E und F und somit deren Verlust eindeutig bewiesen.

Die resultierende OH-Funktion in C-12a trat im 1H NMR Spektren als zusätzliches Singulett bei δ 6,87 in $DMSO-d_6$ (**10**) und δ 4,81 in $CDCl_3$ (**12**) auf. Die ^{13}C NMR Daten für C-12a von **10** und **12** verglichen zu **1** und **3** zeigten mit einer Hochfeldverschiebung von ca. -8 ppm ebenfalls die Veränderung in dieser Position an.

3.5.2.5 Cervimycin I (**9**)

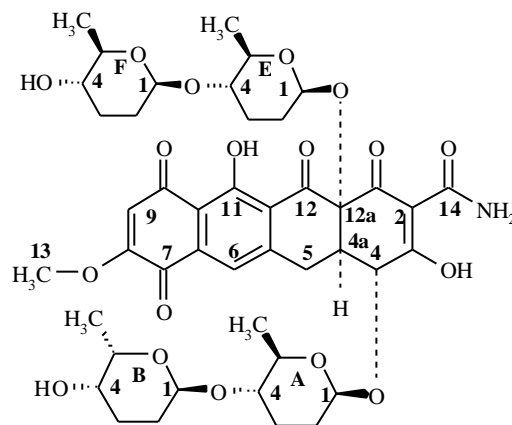


Abb. 25 Struktur von Cervimycin I mit relativer Stereochemie.

Das Cervimycin I wurde der Gruppe C zugeordnet. Die Masse $m/z=885$ von **9** im Vergleich zu **3** spiegelte eine Differenz von $m/z=342$ wieder. Es konnte daher ein Verlust drei masseidentischer Substituenten ($3 \times m/z=114$) abgeleitet werden.

In den ^{13}C und 1H NMR Spektren von **9** waren die Strukturinformationen zu den Hexosen A, B, E und F vorhanden, deren Verknüpfung mit dem Aglykon von H-1E auf C-12a und H-4 auf C-1A sowie die 1,4-Bindungen zwischen E und F bzw. B und A über HMBC Kopplungen bestätigt wurden. Die NMR Shifts für die Hexosen C und D und die Dicarbonsäure fehlten dagegen vollständig.

Die starke Hochfeldverschiebung im ^{13}C NMR des C-4B Shifts von δ 66,83 (**9**) gegenüber δ 74,94 (**3**) war zusätzlich ein Indiz einer ausbleibenden Substitution. Das OH-4B Signal konnte nicht diagnostiziert werden.

3.5.2.6 Cervimycin H (8)

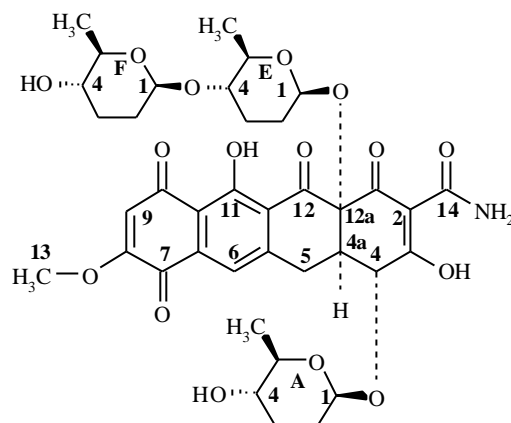


Abb. 26 Struktur von Cervimycin H mit relativer Stereochemie.

Das Cervimycin H, ein Vertreter der Gruppe C, mit $m/z = 771$ wies gegenüber **9** mit einer Differenz von $m/z = 114$ auf den Verlust einer weiteren Hexose hin, was durch die fehlenden 1D NMR Daten der Pyranose B Bestätigung fand. Die Hochfeldverschiebung des C-4A-Signals von $-7,95$ ppm vom substituierten Cervimycin C (**3**) (δ 79,12) zum unsubstituierten Cervimycin H (**8**) (δ 71,17) untermauerte auch hier diese Erkenntnis. Das OH-4A Signal blieb aus.

3.5.2.7 Cervimycin G (7) und Cervimycin M (13)

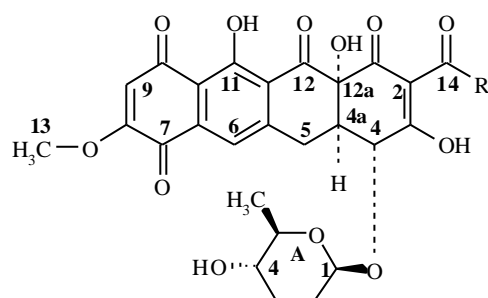


Abb. 27 Strukturen von Cervimycin G ($R = NH_2$) und Cervimycin M ($R = CH_3$) mit relativer Stereochemie.

Diese beiden Cervimycine, **13** der Gruppe A und **7** der Gruppe C zugehörig, zeigten molare Massen von $m/z = 542$ (**13**) und $m/z = 543$ (**7**) und waren somit als Aglyka mit einer substituierten Hexose erkennbar.

Der Vergleich der ^{13}C und 1H NMR Signale zu den anderen Substanzen bewies die Präsenz der Hexose A, deren Position durch die HMBC Korrelation zwischen H-4 auf C-1A des

Aglykons eindeutig ersichtlich war. Das jeweilige OH in C-12a wurde durch die Singulettts δ 4,80 in CDCl_3 (**13**) und δ 6,90 in $\text{DMSO}-d_6$ (**7**) dargestellt. Die C-12a beider Substanzen zeigten wiederum eine starke Hochfeldverschiebung von δ 77,83 (**7**) zu δ 86,22 (**3**) und δ 77,95 (**13**) zu δ 86,25 (**1**) auf Grund des fehlenden Disaccharids.

3.5.2.8 Aglyka, Cervimycin E (**5**) und Cervimycin F (**6**)

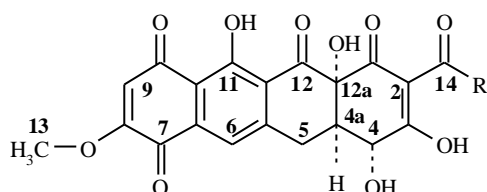
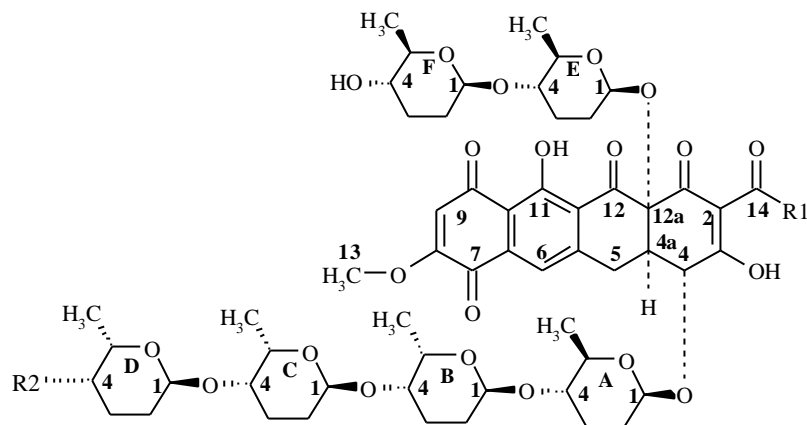


Abb. 28 Strukturen von Cervimycin E ($\text{R} = \text{CH}_3$) und Cervimycin F ($\text{R} = \text{NH}_2$) mit relativer Stereochemie.

Die Identität der Aglyka beider Hauptgruppen A und C konnte an Hand der molaren Massen $m/z = 428$ (**5**) und $m/z = 429$ (**6**) und natürlich dem Ausbleiben sämtlicher NMR Signale der Seitenketten erbracht werden. Neben der nachgewiesenen OH-12a Funktion [δ 6,77 (**5**) und δ 6,85 (**6**)] und der typischen Hochfeldverschiebung in C-12a um -7,4 ppm (**5**) bzw. -8,2 ppm (**6**) wurde das zusätzliche OH-4 mit δ 5,87 (**5**) bzw. δ 5,89 (**6**) gefunden. Das C-4 im Aglykon zeigte erwartungsgemäß ebenfalls Hochfeldtendenz mit δ 68,19 (**5**) bzw. δ 68,11 (**6**) gegenüber δ 74,21 (**1**) und δ 74,14 (**3**).

3.5.3 Allgemeiner Überblick der Cervimycine

Um die Gesamtheit der bearbeiteten Substanzen zu erfassen, sind sie nachfolgend in **Abb. 29** zusammengestellt.



Gruppe A	R1	Hexosen	R2	Darstellung
Cervimycin A (1)	CH ₃	A, B, C, D, E, F	OOCC(CH ₃) ₂ COOH	Fermentation
Cervimycin B (2)	CH ₃	A, B, C, D, E, F	OOCCH(CH ₃)COOH	Fermentation
Cervimycin E (5)	CH ₃	4-OH, 12a-OH	-	Hydrolyse
Cervimycin L (12)	CH ₃	A, B, C, D, 12a-OH	OOCC(CH ₃) ₂ COOH	Hydrolyse
Cervimycin M (13)	CH ₃	A (A4-OH), 12a-OH	-	Hydrolyse
Cervimycin A-Methylester (14)	CH ₃	A, B, C, D, E, F	OOCC(CH ₃) ₂ COOCH ₃	Methylierung
Gruppe C	R1	Hexosen	R2	Darstellung
*Cervimycin C (3)	NH ₂	A, B, C, D, E, F	OOCC(CH ₃) ₂ COOH	Fermentation
*Cervimycin D (4)	NH ₂	A, B, C, D, E, F	OOCCH(CH ₃)COOH	Fermentation
*Cervimycin F (6)	NH ₂	4-OH, 12a-OH	-	Ferm./Hydr.
*Cervimycin G (7)	NH ₂	A (A4-OH), 12a-OH	-	Fermentation
*Cervimycin H (8)	NH ₂	A (A4-OH), E, F	-	Fermentation
Cervimycin I (9)	NH ₂	A, B (B4-OH), E, F	-	Fermentation
*Cervimycin J (10)	NH ₂	A, B, C, D, 12a-OH	OOCC(CH ₃) ₂ COOH	Fermentation
Cervimycin K (11)	NH ₂	A, B, C, D, E, F	OH	Fermentation
Cervimycin C-Methylester (15)	NH ₂	A, B, C, D, E, F	OOCC(CH ₃) ₂ COOCH ₃	Methylierung

*Japanisches Patent : Furui et al., 1994

Abb. 29 Allgemeine Struktur der Cervimycine.

Datenbankrecherchen (SciFinder) zeigten, dass sechs Cervimycine (C, D, F, G, H und J), ausschließlich der Gruppe C, Übereinstimmungen mit Substanzen eines japanischen Patentes (Furui et al., 1994) erkennen ließen. Die Autoren Furui, M. et al. beschrieben für ihre Strukturen eine Prolinyhydroxylasehemmung mit hepatoprotektiver Wirkung. Sie patentierten physikochemische Daten und 1D NMR Daten, gemessen in DMSO-*d*₆ ohne eine genaue Zuordnung der Atome. Defizite in den ¹³C Shifts verhinderten bislang eine entgültige

Definition des Aglykons, vor allem des Ringes A. Außerdem wurden keine Untersuchungen zur relativen und absoluten Stereochemie der Substanzen, insbesondere zur eindeutigen Identifizierung der Monosaccharideinheiten vorgenommen. Es liegt bisher keine Publikation zur Beschreibung dieser Verbindungen vor.

Mit den vorliegenden Ergebnissen ist erstmals eine vollständige Aufklärung des Aglykons gelungen. Es konnte die Gesamtheit der NMR-Daten erfasst und den Atomen zugeordnet werden. Der rechte Teil des Ringes A wurde als β, β' -Triketons eindeutig identifiziert. Durch die Festlegung der Stereochemie von C-4 und C-5, der Bestimmung der Anomerie in C-1 und der absoluten Konfiguration in C-5 der Hexosen war die Beschreibung als β -D-Amicetose und α -L-Rhodinose möglich. Die Strukturen der Gruppe A waren zum ersten mal mit einer Acetylsubstitution in C-2 dieses Aglykons nachweisbar. Sieben Cervimycine (A, B, E, L, M, I und K) und die beiden Methylester können als neue Strukturen vorgelegt werden.

3.6 Diskussion zur Struktur der Cervimycine

3.6.1 Strukturelle Besonderheiten der Cervimycine

Die Cervimycine gliedern sich auf Grund der Struktur ihres Aglykons in die aromatischen Polyketide ein, zu deren wichtigsten bioaktiven Vertretern Tetracycline, Anthracycline, Elloramycine und Tetracenomycine zählen. Darüber hinaus gibt es eine weite Variationsbreite, die durch die Art, Anzahl und Anordnung der vorhandenen Ringe bestimmt wird. Dazu seien die Angucycline, Aureolsäurederivate, Benzoisochromanchinone, Kalafungine und Naphthocyclinone erwähnt (Gräfe, 1992). **Abb. 30** gibt einen Überblick zu den vorzugsweise in Actinomyceten gebildeten Polyketidantibiotika, deren biologische Aktivitäten u.a. von antibakteriell, antifungal, insektizid, immunsuppressiv bis kanzerostatisch reichen.

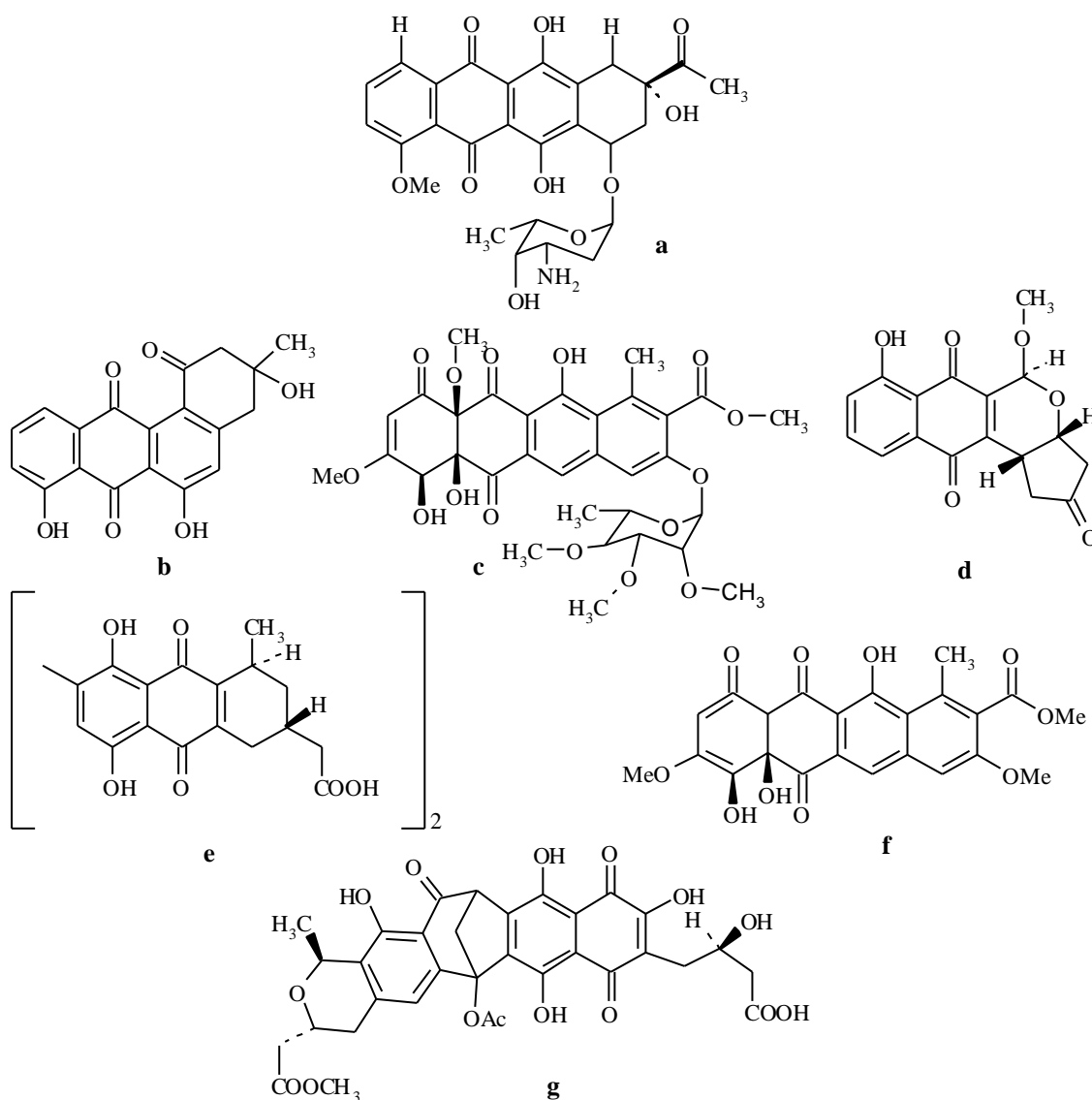


Abb. 30 Auswahl aromatischer Polyketide; a: Daunomycin; b: Rabelomycin; c: Elloramycin; d: Kalafungin; e: Actinorhodin; f: Tetracenomycin; g: a-Naphthacyclinon.

Vertreter der Tetracycline (Oxytetracyclin), Anthracycline (Daunorubicin) und Aureolsäurederivate (Mithramycin) haben Einzug als breitspektrale Antibiotika oder Zytostatika gefunden.

Die homologen Strukturen der Cervimycine sind Vertreter einer bislang wenig untersuchten Strukturklasse von aromatischen Polyketiden. Bisher gibt es mit dem antibakteriellen Polyketomycin (Momose et al., 1998^a) und dem antitumorwirksamen Dutomycin (Xuan et al., 1992) (**Abb. 31**) nur zwei publizierte Vertreter und zusätzlich die im japanischen Patent (Furui et al., 1994) beschriebenen Homologen A2121-1.1 bis A2121-10.1 In allen Fällen handelt es sich um Sekundärmetabolite aus Streptomyceten.

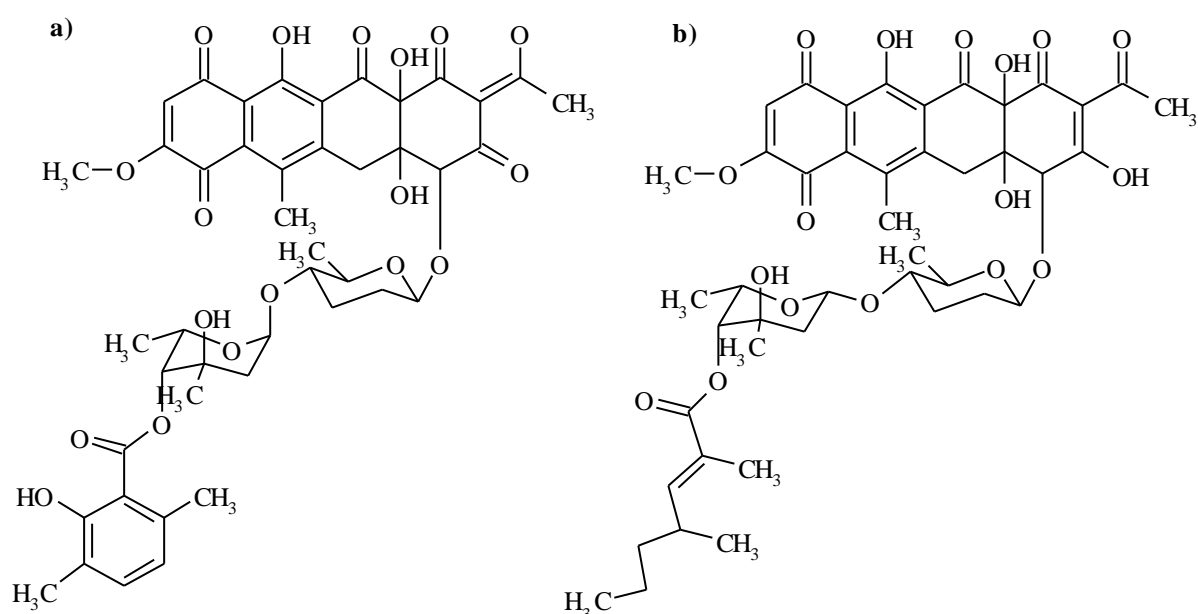


Abb. 31 a: Polyketomycin; b: Dutomycin.

Die gemeinsame strukturelle Besonderheit aller Vertreter dieser Strukturklasse liegt in dem äußeren chinoiden System (Ring D) des Naphthacengrundkörpers und dem OH-11 und der C-12 Ketogruppe in genauer Positionsumkehr zu den klassischen Tetracyclinen. Diese Chinonteilstruktur findet sich nur noch in Naturstoffen mit höherer Ringanzahl, wie in den dimeren Angelmycinen A1, A2 und B aus *Microbispora* sp. (Hori et al., 1996), den Hibarimicinen aus *Microbispora rosea* subsp. *hibaria* (Kajiura et al., 2002) und in denen aus einem Actinomyceten gewonnenen angulären Benzo[a]naphthacenderivaten SF2446 A1-3 und B1-3 (**Abb. 32**; Gomi et al., 1988).

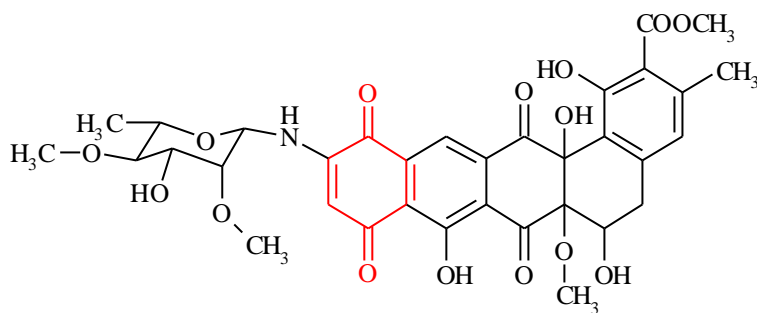


Abb. 32 SF2446 A1 (Gomi et al., 1988).

Im Fehlen der Methylgruppe in C-6 und der OH-Gruppe in C-4a sind Unterschiede im Aglykon der Cervimycine zu denen der verwandten Substanzen Polyketomycin und Dutomycin festzustellen. Außerdem sind die größeren Cervimycine in C-4 und C-12a bisglykosyliert, die in der Anzahl von sechs Hexosen im Vergleich zu anderen Naturstoffen eine sehr hohes Substitutionsmaß aufweisen. Die substituierten 2,3,6-Tridesoxy pyranosen L-Rhodosinose und D-Amicetose finden sich in antibakteriellen Sekundärmetaboliten, vor allem in Anthracyclinen recht häufig, die meistens 1,4-glykosidisch je α oder β verknüpft sein können. Die Besonderheit der Hexosen in den Cervimycinen ist ihre blockartige Anordnung in je drei α -ständigen L-Rhodosinosen und drei β -ständigen D-Amicetosen, die nach bisheriger Kenntnis so noch nicht vorgefunden wurde.

Malonsäure als wichtige Verbindung in vielen Biosyntheseprozessen wird sehr oft in Form ihrer Mono- oder Diester in Naturstoffen verschiedener Genese beobachtet. Man findet sie z.B. als Substituent

- in Malonylniphimycin (Macrolid) aus *Streptomyces hygroscopicus*, (Ivanova et al., 1997)
- in Fomitopsis Säure B (Triterpen) aus dem Pilz *Fomitopsis prinicola* (Rösecke et al., 1999)
- in Trichione (p-Naphthochinonderivaten) aus dem Pilz *Trichia floriformis* (Steglich, 1981)

und

- in Diterpenen aus der semiparasitären Pflanze *Parentucellia latifolia* (Urones et al., 1989)

als Beispiele ihres breiten Vorkommens. Auch die im Japanischen Patent beschriebenen Substanzen A2121-1.1 und A2121-4.1 tragen Malonsäure. In C-2 monoalkylierte oder monoarylierte Malonsäurederivate werden hingegen schon seltener beschrieben, so zum Beispiel in Brasilinolid B aus *Nocardia brasiliensis* (Mikami et al., 2000) oder in Mycochromenderivaten aus *Mycosphaerella rosigena* (Assante et al., 1979). Ein

Monomethylmalonsäuremonoester vergleichend zu den Cervimycinen B und D (vgl. A2121-2.1) wurde bisher zusätzlich nur in A2121-5.1 und dem Angucyclin BA-12100 eines japanischen Patentes (**Abb. 33**; Okabe et al., 1990) nachgewiesen.

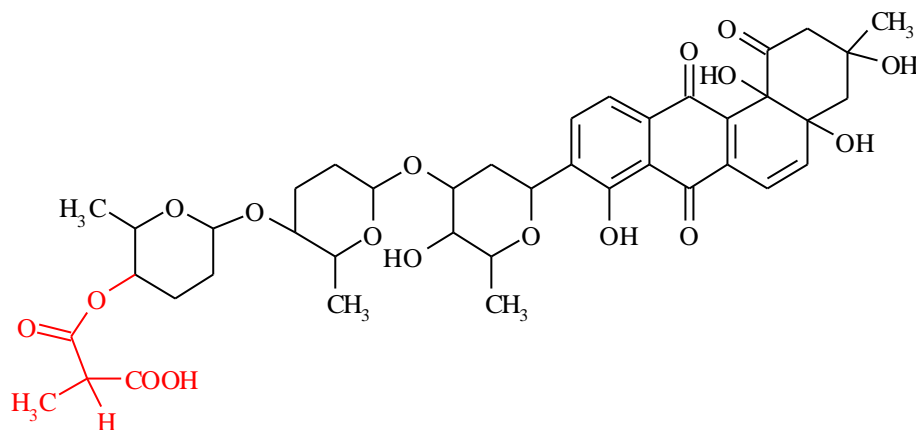


Abb. 33 BA-12100 (Okabe et al., 1990).

Für den Dimethylmalonsäuremonoester hingegen gibt es keinen vergleichbaren Eintrag in Naturstoffen. Er ist somit einzigartig in den Cervimycinen A, C, J, L, beiden Methylestern und den Substanzen A2121-3.1 und A2121-6.1 des japanischen Patentes (Furui et al., 1994).

3.6.2 Tautomerie im Ring A

Für Wirkstoffe, die strukturell zur Tautomerisierung befähigt sind, kann diese Eigenschaft den Angriff am Wirktarget und somit die biologische Aktivität mitbestimmen. Tetracycline können nur wirken, wenn die freie Enolisierbarkeit des Keto-Enols im Ring A gegeben ist. Deshalb wurden verschiedene Untersuchungen auf der Basis von X-Ray-, CD- und NMR-Studien durchgeführt, um genaueren Einblick in die eigentliche Wirkstruktur zu erhalten (Palenik et al., 1978; Mitscher et al., 1970; Celotti et al., 1977). Die neutrale Oxytetracyclinebase liegt in physiologischer Umgebung in zwei tautomeren Formen vor, einer eher hydrophoben nichtionisierten Form zur Penetration durch die Zytoplasmamembran und einer hydrophilen zwitterionischen Form, der die Targetwechselwirkung zugeschrieben wird (**Abb. 34**; Rasmussen et al., 1991).

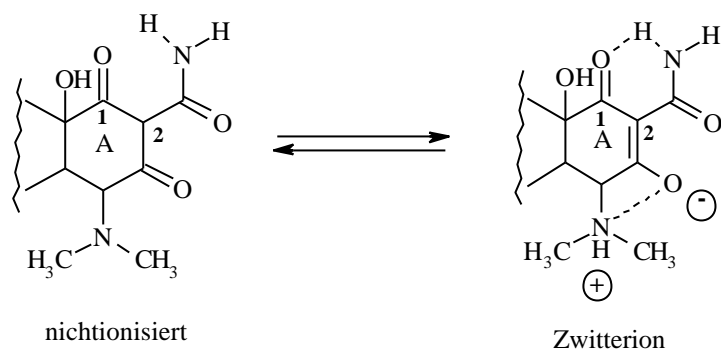


Abb. 34 Wirksame Tautomere im Ring A des Oxytetracyclins nach Stezowski et al., 1976.

Eine absolute Sicherheit für die am Wirkort vorliegende tautomere Tetracyclinform gibt es bis heute jedoch nicht, da die Testergebnisse auf reinen *in-vitro* Untersuchungen beruhen, und der präzise Mechanismus der Bindeprotein-Tetracyclinwechselwirkung nicht bekannt ist (Sum et al., 1998). Auch in der Literatur beschriebene Rückschlüsse des in Festform vorliegenden Tautomers (X-Ray) auf die gelöste Substanz sind wenig vertrauenswürdig. Neueste Stabilitätsuntersuchungen zur Tautomerie und den zahlreichen Konformeren der Tetracyclinbase bewegen sich ebenfalls auf theoretischem Niveau (Othersen et al., 2003).

Eine formale Ableitung einer lösungsmittelabhängigen Tautomerie im Ring A der Cervimycine von den tautomeren Zuständen in den strukturverwandten Tetracyclinen mittels NMR Analyse ist nicht möglich. Da Tetracyclinstrukturen vorzugsweise in Bezug auf ihre Wirkung untersucht wurden, fanden NMR Studien hauptsächlich in wässrigen Lösungsmitteln statt. Obwohl durchaus ^{13}C NMR Differenzen in $\text{DMSO-}d_6$ und D_2O bei Tetracyclinen erkennbar waren, blieb eine Diskussion dieser Ergebnisse aus (Moibroek et al., 1987; Casy et al., 1984; 1985).

Andere zur Tautomerisierung befähigte β, β' -Triketons sind die Acyltetramsäuren, für die vier tautomere Formen existieren (**Abb. 35**). Die nicht durch NMR erfassbaren internen Tautomere (**a-b**; **c-d**) sind durch eine schnelle Umwandlung entlang einer intramolekularen Wasserstoffbrücke gekennzeichnet. Hingegen gehen die externen Tautomere (**a, b** - **c, d**) durch die freie Drehbarkeit des Acylrestes langsam ineinander über und sind im Rahmen der NMR Zeitskala messbar (Forsen et al., 1967). Die NMR Signale der externen Tautomeren bzw. Tautomerenpaare können als Zweiersets auftreten.

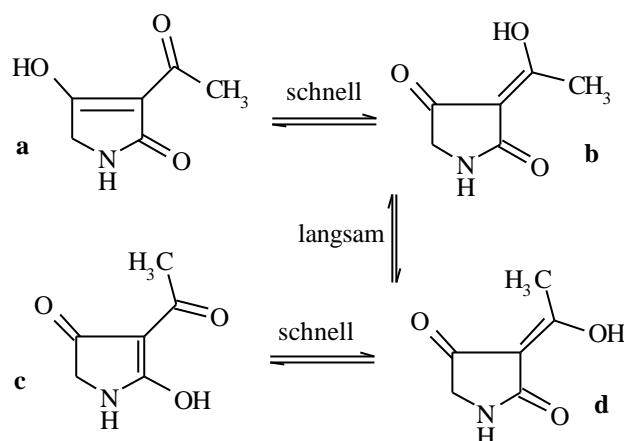


Abb. 35 Tautomerisierung in 3-Acetyltetramsäuren.

Lösungsmittelabhängige NMR Studien von 3-Acetylpyrrolidin-2,4-dion (**Abb.35**) konnten zeigen, dass in polaren Lösungsmitteln 100 % eines externen Tautomerenpaares (**a-b** in DMSO- d_6 oder **c-d** in d -TFA) vorlag, das sich im NMR als Einzelsignale darstellte (Saito et al., 1978). Die Prädominanz eines einzelnen externen Tautomeres oder Tautomerenpaares könnte die Stabilisierung durch intermolekulare Wasserstoffbrücken mit dem polaren Lösungsmittel sein, das die Umwandlung in die zweite externe Form verhindert. In apolaren Lösungsmitteln hingegen lagen beide externen Formen in einem für diese Struktur definierten Verhältnis vor [**a-b** (77 %) und **c-d** (23 %) in CDCl_3] und wurde durch NMR Zweiersets ersichtlich. Steyn und Wessels (1987) konnten für 3-Acetyl-5-isopropylpyrrolidin-2,4-dion das gleichzeitige Vorliegen der einzelnen externen Tautomere **b** und dem bevorzugten **d** in unpolaren Lösungsmittel nachweisen.

Bezugnehmend auf die Erkenntnisse der Acyltetramsäuren in apolaren Lösungsmitteln und der Festlegung der dominanten Tautomerenform **a** oder **b** des Cervimycin C (s. Kap. 3.5.1.1) kann prinzipiell die Koexistenz der externen Tautomere **a** (75 %) und **c** (25 %) bzw. **b** (75 %) und **d** (25 %) oder aber der externen Tautomerenpaare **a-b** (75 %) und **c-d** (25 %) in CDCl_3 postuliert werden. Zur genauen Festlegung der Tautomerisierungstendenz der Cervimycine und deren möglicher Einfluss auf die biologische Wirksamkeit müssten eingehendere Untersuchungen, hierfür vor allem auch in hydrophileren Lösungsmitteln, durchgeführt werden.

3.6.3 Stereochemie der Monomethylmalonsäure

Tab.4 Doppelte ^{13}C und ^1H NMR Signale in der Monomethylmalonsäure.

^{13}C Pos.	d_{C} [ppm]	d_{H} [ppm] (J in Hz)
1'	170,56	q
	170,68	q
2'	46,74	3,91q (7,2)
	46,93	3,92q (7,2)
3'	13,86	1,67d (7,3)
	13,86	1,66d (7,2)
4'	172,42	q
	172,48	q

Die Zweiersets der ^{13}C und ^1H Signale der Monomethylmalonsäure (**Tab. 4**) und der angrenzenden Pyranose D konnten in Cervimycin B und D (beide Pyridin- d_5), als auch in A2121-2.1 (DMSO- d_6 ; Furui et al., 1994) gefunden werden. Mögliche Keto-Enol-Tautomere können ausgeschlossen werden. Die Werte sprechen einzig für die Diketoform, da kein quaternäres Kohlenstoff für C-2', wie im Fall des Enolats oder des Enols diagnostiziert wurde (**Abb. 36**). Außerdem ist die Enolform dieser *cis*-fixierten β -Dicarbonylverbindung mit intramolekularer Chelatisierungstendenz nur in apolaren Lösungsmitteln, die nicht zu Wasserstoffbrückenbildung befähigt sind, zu finden (Eistert et al., 1961).

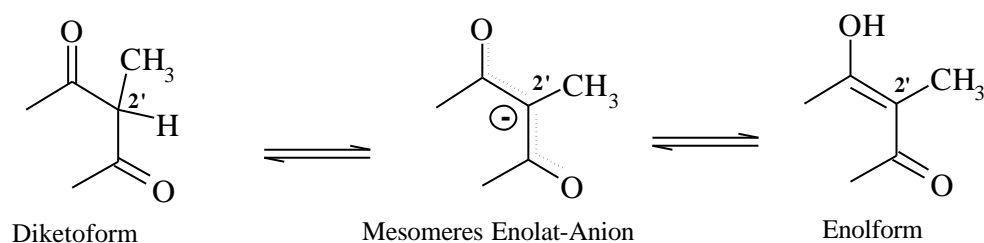


Abb. 36 Keto-Enol-Tautomerie der Monomethylmalonsäure (Ausschnitte).

Die Vermutung, dass es sich um Rotamere des Monomethylmalonsäureesters handeln könnte, die durch sterische Hinderung in ihrer Rotation um die Esterbindung gehemmt sind, wurde verworfen, da sogar für die Dimethylmalonsäurederivate auf Grund der zwei Methylsubstituenten bevorzugt NMR Doppelpeaks zu erwarten gewesen wären.

Somit konnten Diastereomerenpaare für Cervimycin B und D abgeleitet werden, die mit S- oder R-Monomethylmalonsäure verestert sind. Für diese Theorie spricht auch, dass die doppelten ^{13}C und ^1H Shifts in einem Verhältnis von 1:1 vorlagen, und dass die NMR

Besonderheiten nur bei der chiralen Monomethylmalonsäure und nicht bei der achiralen Dimethylmalonsäure oder Malonsäure der Struktur A2121-1.1 (Furui et al., 1994) auftraten.

3.7 Biologische Aktivität der Cervimycine

Auf der Suche nach neuen Antibiotika stand für die Cervimycine das antibakterielle Screening im Vordergrund. Um jedoch das Wirkprofil der Cervimycine besser abzuschätzen, wurden zusätzliche im HKI etablierte biologische Methoden einbezogen. Die unter Kapitel 3.7.1 bis 3.7.6 beschriebenen Tests wurden in Zusammenarbeit mit den Abteilungen Infektionsbiologie und Wirkstoffprüfung am HKI und Institut für Virulogie und antivirale Therapie der FSU Jena durchgeführt. In der antibakteriellen Testung und im Interkalationstest wurde die Strukturverwandtschaft der Cervimycine mit den Tetracyclinen und Anthracyclinen berücksichtigt. Bei allen durchgeführten Tests handelte es sich um *in vitro*-Methoden.

3.7.1 Antibakterielle Testung

Wahl der Testkeime:

Die antimikrobiellen Untersuchungen der Cervimycine erfolgte nach den Ergebnissen des Vorscreening ausschließlich gegen Gram-positive Keime. Bei den Testkeimen handelte es sich um *Bacillus subtilis* 6633, *Staphylococcus aureus* SG511, dem gegen verschiedene Antibiotika Efflux-resistenten *Staphylococcus aureus* EfS4 und die beiden Nosokomialkeime multiresistenter *Staphylococcus aureus* 134/94 und vancomycinresistenter *Enterococcus faecalis* 1528.

Durch Testung der Cervimycine gegen Keime mit definierter Tetracyclinresistenz wurde erwartet, indirekte Hinweise auf das Wirktarget zu erhalten. Wenn Kreuzresistenz zwischen einem neuen und bekannten Antibiotikum auftritt, ist es möglich, dass beide den gleichen Wirkmechanismus haben. Besteht keine Kreuzresistenz kann es Hinweise auf unterschiedliche Angriffsorte der beiden Antibiotika geben. Dieser Zusammenhang kann als ein Bestandteil bei der Suche von Targets neuer Strukturen genutzt werden (Lancini et al, 1995).

Für diese Untersuchung wurden *Enterococcus faecalis*- und *Enterococcus faecium*-Stämme mit definierter Tetracyclin-Effluxresistenz und / oder -Targetresistenz herangezogen. Für die Identifikation der Resistenzen wurden die passenden Resistenzgene mittels PCR nachgewiesen. Die Isolate stellte uns das Robert-Koch-Institut, Wernigerode zur Verfügung.

Target (*tet M*)- und Effluxresistenz (*tet L*)

Targetresistenz (*tet M*)

E. faecalis UW 3653-1

E. faecalis UW 3659

Test:

Vorerst wurde mittels Lochplatten-Agardiffusionstest die biologische Aktivität aller Cervimycine untersucht. Substanzen, die in mindestens 50 % der untersuchten Keime einen klar abgegrenzten Hemmhof von >10 mm zeigten, wurden der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK; **Tab. 5**) unterzogen. Diese erfolgte mittels Mikrotitertest für Aerobier. Als relevante Vergleichssubstanzen kamen Tetracyclin HCl, Vancomycin HCl und Ciprofloxacin HCl zur Anwendung.

Referenzen zur Durchführung:

Lochplattentest nach EAB 3, deutsche Ausgabe, 1997 und MHK nach NCCLS, 1997.

Ergebnisse:

Von den 15 Cervimycinen konnte für neun Cervimycine (A, B, C, D, I, J, K und die beiden Cervimycin-methylester) eine antibakterielle Wirksamkeit nachgewiesen werden. Die Cervimycine E, F, G, H, M und L hingegen ergaben keine auffallende biologische Aktivität im Lochplattentest.

Tab.5 MHK-Werte der zehn relevanten Cervimycine (*in vitro*).

			Nosokomialkeime			def. Tetracyclinresistenz		
Cervimycin	6633	SG511	MRSA	VRE	EfS4	tetM/L 3653-1	tetM/L 3634	tetM 3659
A	0,8	3,125	6,25	3,125	3,125	12,5	3,125	6,25
B	1,56	25	12,5	12,5	6,25	25	6,25	25
C	0,4	12,5	25	3,125	3,125	6,25	0,8	1,56
D	0,1	3,125	6,25	1,56	6,25	0,4	0,8	1,56
I	12,5	6,25	>100	>100	25	>100	>100	>100
J	6,15	25	12,5	>100	6,25	>100	>100	100
K	<0,05	0,8	0,8	0,4	0,8	0,8	0,8	0,8
A-methylester	0,4	3,125	12,5	3,125	3,125	3,125	3,125	6,25
C-methylester	-	12,5	25	12,5	12,5	12,5	6,25	12,5
Tetracyclin HCl	0,2	0,4	25	100	>100	>100	>100	>100
Vancomycin	0,2	0,8	1,56	>100	1,56	1,56	0,8	-
Ciprofloxazin	<0,05	0,2	12,5	0,8	100	3,125	100	1,56

6633 = *B. subtilis*, SG511 = *S. aureus* SG511, MRSA = multiresistenter *S. aureus* 134/94, VRE = *E. faecalis* 1528, EfS4 = *S. aureus* EfS4, tetM/L 3653-1 = *E. faecalis* UW 3653-1, tetM/L 3634 = *E. faecium* UW 3634, tetM 3659 = *E. faecalis* UW 3659.

Die schon unter den Auswahlkriterien des Vortests als schwach wirksam eingeschätzten Cervimycine I und J mit durchschnittlichen Hemmhöfen von 10 mm und 12,5 mm erreichten keine nennenswerte MHK gegen irgendeinen der Testorganismen.

Die Hauptkomponenten Cervimycin A und C wiesen annähernd vergleichbare Aktivitäten auf, wobei für Cervimycin A eine tendentiell erhöhte Aktivität gegen Staphylokokken, einschließlich multiresistenten *Staphylococcus aureus* 134/94 (MRSA), hervorging. Die Hemmung des unspezifischen tetracyclinresistenten *Staphylococcus aureus* J10 (nicht in **Tab. 5** aufgenommen) mit 3,125 µg/ml für Cervimycin A gegenüber 25 µg/ml für Cervimycin C unterstrich dieses Ergebnis zusätzlich. Die Vorteile des Cervimycin C hingegen lagen eindeutig in der Wirkung gegen tetracyclinresistente Enterokokken. Aus der Testung gegen vancomycinresistenten *Enterococcus faecalis* 1528 (VRE) resultierte für beide Hauptkomponenten eine gleichwertig hohe Wirkung.

Im Vergleich der beiden Monomethylmalonsäureester zeichnete sich Cervimycin D zu Cervimycin B mit einer besseren Wirksamkeit über das gesamte Testprofil aus. In Bezug auf die Hauptkomponente Cervimycin C konnte für Cervimycin D eine annähernd äquivalente Aktivität gegen tetracyclinresistente Enterokokken bestimmt werden, während der Wirkeffekt gegen die Gesamtheit der Staphylokokken und gegen vancomycinresistenten *Enterococcus* (VRE) sichtbar gesteigert war. Für Cervimycin B im Verhältnis zu Cervimycin A trat in allen Fällen eine Verschlechterung der Wirkung auf.

Der Cervimycin A-methylester wies eine gesteigerte biologische Aktivität gegenüber dem Cervimycin C-methylester auf. Während sich für den Cervimycin C-methylester durchweg eine wesentliche Wirkungsverschlechterung im Vergleich zur Hauptkomponenten Cervimycin C ergab, hatte der Cervimycin-A-methylester den Wirkstatus von Cervimycin A.

Cervimycin K zeigte die höchste biologische Potenz von therapeutischer Relevanz gegen alle getesteten Keime. Seine Wirkung gegen tetracyclinsensiblen *Staphylococcus aureus* SG511 war vergleichbar mit der von Tetracyclin HCl. Außerdem wirkte Cervimycin K tendentiell stärker als Vancomycin HCl gegen den in dieser Beziehung interessanten multiresistenten *Staphylococcus aureus* 134/95. Die Aktivität des Cervimycin K im Vergleich zu Chinolonantibiotika (Ciprofloxazin HCl) war gegen tetracyclinresistente Enterokokken und MRSA verbessert und gegen VRE gleich stark ausgeprägt.

Der nachteilige Effekt des Antibiotika-unspezifischen aktiven Efflux von Tetracyclin HCl und Ciprofloxazin durch EfS4 konnte für keines der Cervimycine beobachtet werden.

In einem speziellen Target-Test der Firma Bayer wurde für Cervimycin A und C die MHK für die Hemmung der ribosomalen Proteinbiosynthese mit <100 µg/ml bestimmt. Eine effektive Proteinsynthesehemmung wird allgemein mit <10 µg/ml angenommen, so dass die untersuchten Cervimycine als unwirksam eingestuft wurden.

3.7.2 Antiproliferation und Zytotoxizität

Test:

Die Tests zur Untersuchung der Antiproliferation und Zytotoxizität der Cervimycine wurden mittels klassischen *in vitro*-Verfahren in Mikrotiterplatten an Zellkulturen entsprechender Zelllinien durchgeführt. Die GC₅₀-Werte (Konzentration bei 50 %iger Wachstumshemmung) als Maßstab zytostatischer Effekte konnte aus Bestimmungen des Zellwachstums und Zellgrößenverteilung (Impulsmessung mit CASY 1) mit Zellsuspensionen einer Mäusefibroblastenzelllinie L929 und humaner Leukämiezelllinie K562 ermittelt werden. Die Zytolyseaktivität auf HeLa-Zellen wurde an Hand der CC₅₀-Werte (Konzentration bei 50 %iger Zellabtötung) durch Extinktionsmessung erfasst.

Referenz zur Durchführung:

Dahse et al., 2001

Ergebnisse:

Tab.6 Antiproliferative und zytotoxische Aktivität (*in vitro*) der neun relevanten Cervimycine.

Cervimycin	Antiproliferation		Zytotoxizität
	L-929 GC ₅₀ [µg/ml]	K-562 GC ₅₀ [µg/ml]	HeLa CC ₅₀ [µg/ml]
A	24,7	4,4	>50
B	>50	>50	>50
C	>50	10,2	>50
D	11,9	7,2	>50
I	>50	46,7	>50
J	30,8	6,6	31,4
K	1,5	0,8	12,4
A-methylester	1,1	1,1	15,8
C- methylester	1,2	0,3	5,5

Die Zytolysestudien an adhärennten humanen HeLa-Zellkulturen ergaben bis auf den Cervimycin C-Methylester moderate Zytotoxizität (10-100 µg/ml) der getesteten Cervimycine. Gute Antiproliferation konnte für Cervimycin K und die beiden Cervimycin-methylester in Untersuchungen an murinen Fibroblasten und humanen Leukämiezellen

nachgewiesen werden. Für die Cervimycine A, B, C, D und K war eine Korrelation steigender antimikrobieller und antiproliferativer Wirkung zu erkennen (**Tab 6**).

3.7.3 Antivirale Testung

Pathophysiologischer Hintergrund:

Die Replikation einiger Viren führt zur völligen Zerstörung definierter Wirtszellen. Dieser sogenannte zytopathische Effekt (zpE) kann durch antivirale Substanzen gehemmt werden. Dabei ist es unabhängig, welche Stufe des Replikationszyklusses inhibiert wird.

Test:

Diese Hemmung des Virus-induzierten zpE wurde zur Bestimmung antiviraler Eigenschaften der Cervimycine als Testprinzip herangezogen. Die Testung erfolgte im nicht-zytotoxischen Dosisbereich gegen folgende Testsysteme (Virus / Wirtszellen):

- Cocksackievirus B3 Nancy (CVB3) / HeLa-Zellen
- Influenzavirus A Hong Kong / Madin Darby canine kidney Zellen (MDCK)
- Herpes simplex Virus Typ 1 Stamm K1 (HSV1 K1) / Green monkey kidney Zellen (GMK)

Die Quantifizierung fand an Hand des Vergleiches der optischen Dichte von Substanz-behandelten und -unbehandelten infizierten Zellen statt.

Dieser Test gibt Hinweise zu antiviralen Effekten, aber nicht zum Target der antiviralen Wirkung. Das System ist ein Prä-Test mit hohem Durchsatz an Substanzen, aus dem anschließend positive Hits in speziellen Rezeptorsystemen getestet werden.

Referenz zur Durchführung:

Schmidtke et al., 2001.

Ergebnisse:

Von acht getesteten Cervimycinen wurde für die Cervimycine A, G, und I schwache antivirale Effekte gegen Cocksackievirus detektiert, d.h. eine Hemmung des Virus-induzierten zpE in mindestens 2 Konzentrationsstufen zu 30-50 % festgestellt. Diese Hemmung war nicht ausreichend signifikant, um die Substanzen weiterführenden Tests (z.B. Rezeptorbindungs-Assays) zu unterziehen.

3.7.4 Einfluss auf die Phagozytoseaktivität

Pathophysiologischer Hintergrund:

Phagozytische Zellen sind ein wichtiger Teil der sog. „first defense line“ bei Infektionen. Die Phagozytenaktivität äußert sich in dem „oxidativen burst“ durch Freisetzung reaktiver

Sauerstoffspezies (ROS), worüber die Phagozyten ihre microbizide und tumorizide Wirkung ausüben. Mikroorganismen, Serum-opsoniertes Zymosan (SOZ) oder Phorbolester (PMA) lösen als Triggersubstanzen die Sequenz der Reaktion aus, und chemische Stoffe (u.a. Arzneistoffe) können wiederum die ROS-Freisetzung modulieren.

Test:

Über die mit der Chemilumineszenz-Technik registrierbaren ROS in Reaktion mit Luminol oder Lucigenin wurde geprüft, inwiefern die Cervimycine einen modulierenden Effekt auf die SOZ bzw. PMA induzierte Phagozytenaktivität von Hunde-PMNL (polymorphonukleare Leukocyten) haben.

Referenz zur Durchführung:

HKI-Methodenkatalog zur Testung von Reinsubstanzen, 1998.

Ergebnisse:

Alle getesteten Cervimycine verursachten eine 20 bis 30%ige Hemmung (Kategorie „1“= vereinbarter Schlüssel der DBL-Datenbank am HKI) der induzierten Sauerstoffradikal-freisetzung und beeinflussten somit in geringen Umfang die Phagozytenaktivität.

3.7.5 Funktionelle Transkriptions-Assays

Diesen Untersuchungen wurden die Hauptkomponenten Cervimycin A und C zugeführt. Nach der Beschreibung der Tests sind die Ergebnisse aller funktionellen Transkriptions-Assays unter Kapitel 3.7.5.3 zusammengefasst.

3.7.5.1 Einfluss der Tax/CREB Protein/Protein-Interaktion bzw. der Tax/CREB/LTR Protein/DNA-Interaktion

Pathophysiologischer Hintergrund:

Der Retrovirus HTLV-I ((human T-cell leukemia virus type I) befällt T-Lymphozyten und ist für die adulte T-Zell-Leukämie sowie die HTLV-I assoziierte Myelopathie verantwortlich. Der Transkriptionsfaktor Tax, der durch das HTLV-I-Genom kodiert wird, ist ein wichtiger Modulator viraler, aber auch zellulärer Genexpression. Es wird postuliert, dass Tax mit zellulären Proteinen der ATF/CREB-Familie (Transkriptionsfaktoren) interagiert und gemeinsam durch Angriff an das „long terminal repeat“ (LTR-DNA-Element) die Transkription viraler Gene steuert und somit die Genexpression kontrolliert.

Test:

Zur Untersuchung einer inhibitorischen Wirkung der Cervimycine A und C der Tax/CREB Protein/Protein-Interaktion oder der Tax/CREB/LTR/Protein/DNA-Interaktion wurde das von

Shnyreva und Munder (1996) entwickelte Assay in *Saccharomyces cerevisiae* herangezogen. Das Testprinzip baut darauf auf, dass eine Interaktion zwischen Tax und CREB zu einer Anbindung an zwei „long terminal repeats“ führt, was sekundär die Transkription des *lacZ*-Reportergens induziert. Die Bildung der β -Galactosidase verursacht die Spaltung eines farblosen galactosidischen Substrates zu einem gelben Chromophor, welches spektroskopisch vermessen wird. Ein Inhibitor ist durch ein zum Leerwert geringeres Signal gekennzeichnet.

Referenz zur Durchführung:

Shnyreva und Munder, 1996

3.7.5.2 Einfluss der Interaktion des oncogenen c-Myc-Transkriptionsfaktors mit seinem Partnerprotein Max

Pathophysiologischer Hintergrund:

Das menschliche Protooncogen c-myc ist das Homologe des transformierenden Oncogens des Myelocytomatosevirus MC29 aus dem Huhn. Myc-Protein-Gene sind zahlreich in menschlichen Tumorarten durch Mutation verändert (Knippers, 2001). Ihre deregulierte Expression trägt kausal zur Entstehung der Tumoren bei. Myc-Proteine entfalten verschiedene Aktivitäten, wie die Regulation des Zellzyklus oder die Hemmung der Zelldifferenzierung, die zur Transformation der Zellen führen. Sie können aber auch die Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) vermitteln.

Myc bildet mit dem Partnerprotein Max einen heteromeren Transkriptionsfaktor, der an die sogenannten E-Boxen der DNA bindet. Der Myc/Max-Komplex reguliert als potenter Aktivator eine Reihe von Genen, deren Genprodukte einen Einfluss auf die Zelltransformation zur Folge haben. Spezifische Myc/Max-Antagonisten wären daher von außerordentlichem Interesse in der Krebstherapie.

Test:

Die Untersuchung erfolgte in einem Zwei-Hybrid-System, ebenfalls integriert in *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei führt die Interaktion zwischen einem Teil der Max-Dimerisierungsdomäne (HLH-LZ) und Myc zu einer Wiederherstellung des Transkriptionsfaktors GAL4, woraus die Expression des β -Galactosidase-Reportergens resultiert. Die Expressionsrate des Reportergens wurde durch Spaltung eines farblosen galaktosidischen Substrates in Entstehung eines gelben Chromophores spektrometrisch quantifiziert. Somit hat eine Hemmung der Protein/Protein-Interaktion eine Absenkung der Extinktion gegenüber dem Leerwert zur Folge.

Referenz zur Durchführung:

Munder et al., 1997

3.7.5.3 Einfluss der Interaktion des oncogenen c-Myc-Transkriptionsfaktors mit seinem Partnerprotein Miz-1

Pathophysiologischer Hintergrund:

Neben der durch Myc-Proteine vermittelte Genaktivierung, gibt es auch den negativen Einfluss auf die Genexpression. Das Myc interacting zinc finger protein (Miz-1) allein bewirkt die Expression von Genen, die zum Stillstand des Zellzyklus vor Eintritt in die Mitose führen. Das Zusammenspiel beider Transkriptionsfaktoren Myc und Miz-1 kann den Zellzyklusarrest teilweise aufheben und eine unkontrollierte Zellvermehrung einleiten. Eine Unterbindung der Protein/Protein-Wechselwirkung durch kompetente Substanzen bedeutet daher einen weiteren wichtigen Schritt in der Hemmung von Tumoren.

Test:

In Analogie zur Untersuchung des Myc/Max-Komplexes wurde hier ebenfalls ein Zwei-Hybrid-System in *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Die Aktivierung von GAL-4 wird durch das Zusammentreffen der basischen- Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper (bHLH-LZ)-Domäne von Myc mit Miz-1 verursacht und leitet den gängigen Algorithmus zur Bildung des farbigen messbaren Chromophores ein (§. Kap. 3.7.5.2), dessen Absorption durch einen Myc/Miz-1-Inhibitor vermindert wird.

Referenz zur Durchführung:

Munder et al., 1997

Ergebnisse aller drei Transkriptions-Assays:

Die diesen Untersuchungen zugeführten Cervimycine A und C ergaben in allen drei Tests Hemmwerte von 0 bis 11 % und wurden somit in der Kategorie „0“ erfasst und ohne Wirkung deklariert. Ein schwacher Effekt wird im Vergleich mit 25 bis 50 %iger Hemmung (Kategorie „1“) beschrieben. Standardsubstanzen stehen derzeit für alle drei Tests noch nicht zur Verfügung.

3.7.6 Spezielle Enzymtests

3.7.6.1 Horse-radish Peroxidase (HRP)-Test

Pathophysiologischer Hintergrund:

Eine Überhandnahme aktiver Sauerstoffspezies unter pathophysiologischen Umständen wird als „Oxidativer Stress“ bezeichnet. Die extreme Instabilität der Radikale verursacht im Körper

chemische Läsionen durch oxidative Veränderungen essentieller Zellbestandteile wie Membranlipide oder Nucleinsäuren (Blandini et al., 1999). Ist die Eliminierung der Radikale durch körpereigenen Schutzmechanismen, wie die Enzyme Katalase und Superoxiddismutase oder die Antioxidantien Ascorbinsäure und Glutathion nicht mehr ausreichend, kommt es zu irreversiblen DNA- und Zellmembranschädigungen. Neben der Beteiligung am normalen Alterungsprozess sind Sauerstoffradikale bei der Entstehung degenerativer Erkrankungen wie Atherosklerose und Ischämie und der Tumorentstehung mitverantwortlich. Darüber hinaus haben sie Anteil am neuronalen Zelltod und werden als einer der zugrundeliegenden Mechanismen der Entstehung der Alzheimer'schen Demenz und Morbus Parkinson beschrieben (Schmidt, 2003).

Test:

Die HRP baut Wasserstoffperoxid zu OH⁻-Radikalen und H₂O ab. Das Enzym wurde zum Test auf Peroxidase-hemmende und Scavenger-Eigenschaften (Radikalfang) der Cervimycine genutzt. Die Quantifizierung der vorhandenen OH⁻-Radikale erfolgte in Chemilumineszenzdetektion oxidierten Luminols. Mit Hilfe dieses Tests lässt sich spekulativ zwischen Enzymhemmung und Scavenger-Eigenschaften unterscheiden. Ist die Chemilumineszenz während der gesamten Testzeit verringert und fehlt eine anfängliche lag-Phase liegt Enzymhemmung vor. Tritt eine lag-Phase auf, ist die Chemilumineszenzabschwächung auf Radikalfängereigenschaften zurückzuführen.

Referenz zur Durchführung:

HKI-Methodenkatalog zur Testung von Reinsubstanzen, 1998

Ergebnisse:

Werte von >70 % RLU (relative Lichteinheiten) registriert für alle getesteten Cervimycine (16 µg/ml) gegenüber dem Leerwert ohne Cervimycinzugabe von 100 % RLU ließen weder auf eine Enzymhemmung noch auf Radikalfängereigenschaften schließen. Der Vergleich mit der effektiven Standardsubstanz N-Acetylcystein mit 10-40 % RLU (16 µg/ml) erhärtete dieses Ergebnis.

3.7.6.2 3a-Hydroxysteroiddehydrogenase (3a-HSD)-Test

Pathophysiologischer Hintergrund:

Der belebte Organismus reagiert auf Zell- oder Gewebeschädigung unterschiedlicher Ursache mit einer Reihe vitaler Reaktionen, die als Entzündung bezeichnet werden. Die Inhibition entzündungsvermittelnder molekularer als auch zellulärer Ereignisse ist die Grundlage einer antiinflammatorischen Wirkung. In vitro-Testsysteme zielen auf die Hemmung von in das

Entzündungsgeschehen involvierter Enzyme ab, wie die Prostaglandin H-Synthetase oder die 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase, die beide von nichtsteroidalen Antiphlogistika konzentrationsabhängig inhibiert werden können.

Test:

Die Hemmung der NADPH-abhängigen 3 α -HSD verhindert den Abbau antiphlogistisch wirksamer Glucocorticoide (z.B. 5 β -Dihydrocortison) und vermittelt somit sekundär eine anhaltende antiinflammatorische Wirkung. Die Cervimycine wurden in diesem Test auf entzündungshemmende Eigenschaften untersucht.

Die Detektion erfolgte durch Messung der Extinktionsabnahme, verursacht durch den NADPH-Verbrauch der 3 α -HSD.

Referenz zur Durchführung:

HKI-Methodenkatalog zur Testung von Reinsubstanzen, 1998.

Ergebnisse:

Keines der getesteten Cervimycine (alle Kategorie „0“) erreichte annähernd die Wirkung der nichtsteroidalen Antiphlogistika [Indomethacin (IC₅₀ bei 2.8x10⁻⁷ M), Ketoprofen (IC₅₀ bei 7.86x10⁻⁷ M) und Ibuprofen (IC₅₀ bei 5.8x10⁻⁵ M), der Kategorie „2“] im Vergleich der IC₅₀-Werte auf molarer Basis. Daher wurden sie als unwirksam eingestuft.

3.7.7 Zusammenfassung der nicht-antibakteriellen Testergebnisse

Tab.7 Gesamtheit der nicht-antibakteriellen Testergebnisse.

Cervimycin	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	14	15
Test															
Coxsackie CVB3	1	0	0	0	n.b.	0	1	0	1	0	0	0	n.b.	0	n.b.
Influenza A	0	0	0	0	n.b.	0	0	0	0	0	0	0	n.b.	0	n.b.
Herpes HSV1	0	0	0	0	n.b.	0	0	0	0	0	0	0	n.b.	0	n.b.
c-Myc/Max	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
c-Myc/Miz	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tax/CREB/LTR	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.	0	1
HRP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.	0	0
Phagozytentest	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	n.b.	1	1

n.b. nicht bestimmbar auf Grund zu geringer Substanzmengen oder Instabilität der Substanz unter den Testbedingungen; - keine Messung erfolgt; Kategorie 0: keine Wirkung ; 1: moderate Wirkung.

3.7.8 Spezielle Untersuchungen zur Erfassung des Wirktargets

3.7.8.1 Interkalationstest

Auf der Suche des Wirktargets wurde die Möglichkeit eines interkalierenden Effektes der Cervimycine auf Grund der Strukturähnlichkeit zu den Anthracyclinen in Betracht gezogen.

Test:

Die Interkalation von farbigen planaren Chromophoren, wie es die Anthracycline darstellen, geht mit einer typischen Veränderung ihrer Vis-Spektren einher, d.h. die Zugabe von DNA zu einer Anthracyclinlösung bewirkt eine Abnahme der Absorption und ab einem bestimmten Verhältnis von DNA/Ligand eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums (Calendi et al., 1965). Auf diesen Zusammenhang wurde die Untersuchung interkalierender Eigenschaften der biologisch potentesten Cervimycine (A, C, D und K) aufgebaut. Der Test wurde in Anlehnung an Schütz et al. (1979) mittels Titrationsmethode durchgeführt. Entgegen ihrer Vorgehensweise, der Zugabe von Ligandenlösung zu einer vorgelegten DNA-Lösung, wurde in diesem Test die Wirkstofflösungen vorgelegt und Aliquote an DNA-Lösung hinzugegeben (s. Kap. 5.11).

Die Dimerenbildung von Anthracyclinen wurde dabei vernachlässigt, da es sich um eine rein qualitative Messung und nicht um die Bestimmung von Bindungsparametern handelte. Streuungseffekte konnten durch gleichzeitige Zugabe von DNA-Lösung zur Mess- und Vergleichslösung eingedämmt werden.

Ergebnisse:

Für das Daunomycin bestätigte sich erwartungsgemäß mit steigender Konzentration an Kalbs-Thymus-DNA (ca. 42 % GC-Gehalt) die Abnahme der Extinktion und die Verlagerung des Absorptionsmaximums von 480 nm auf 505 nm in den längerwelligen Bereich ab einem DNA/Daunomycin-Verhältnis von ca. 2,7/1 (**Abb. 37**). Die Cervimycine (Cervimycine A, C, D und K) mit einer Konzentration weit über ihrer minimalen Hemmkonzentration wiesen weder eine signifikante Absenkung der Extinktion, noch eine Veränderung des Absorptionsmaximums auf, so dass ihnen kein Interkalationseffekt zugeschrieben werden konnte. Die Erhöhung des DNA/Cervimycin-Verhältnisses auf 30:1, gemessen bei geringerer Cervimycinkonzentrationen (10 µM), ergab gleiche Ergebnisse. Die unwesentliche Extinktionsabnahme in den Spektren der Cervimycine ließ sich durch den Verdünnungseffekt in Zugabe der DNA-Lösung erklären, was durch die DNA-äquivalente Aliquotierung von reinem Puffer zu einer Cervimycin C-Lösung nachweisbar war.

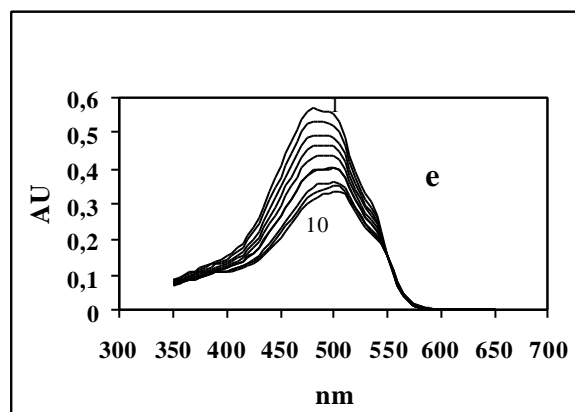
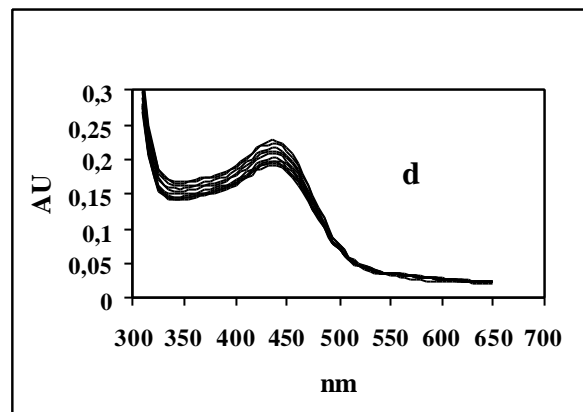
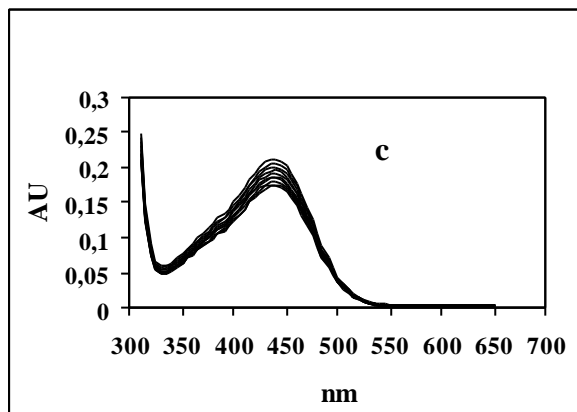
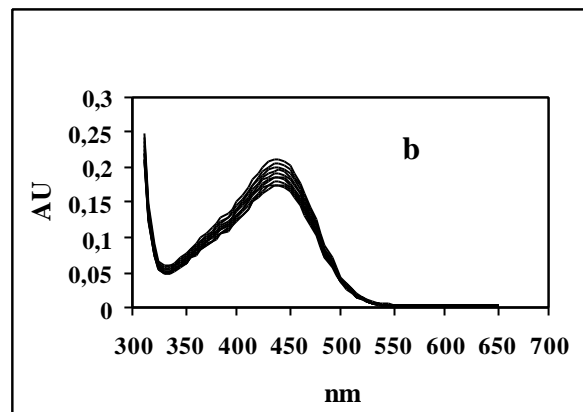
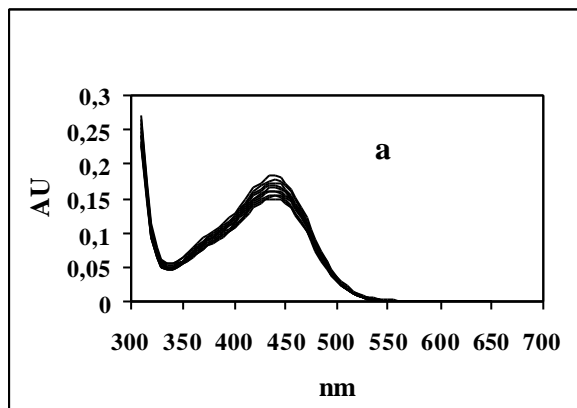


Abb. 37 Interkalationstest: Veränderung des visuellen Spektrums von

a: Cervimycin A (50 µM),

b: Cervimycin C (50 µM),

c: Cervimycin D (50 µM),

d: Cervimycin K (50 µM),

e: Daunomycin (50 µM)

bei steigender DNA-Konzentration (Kurve 1: ohne DNA; 2: 33,4 µM DNA; 3: 66,8 µM DNA; 4: 100,2 µM DNA; 5: 133,6 µM DNA; 6: 176,0 µM DNA; 7: 200,4 µM DNA; 8: 233,8 µM DNA; 9: 267,2 µM DNA; 10: 300,2 µM DNA).

Die in **Abb. 38** erfasste relative Abnahme der Extinktion verdeutlicht nochmals den Unterschied im Anstieg der Kurve des Interkalators (Daunomycin) zu den Cervimycinen. Die Extinktionsabnahme der Cervimycine A, C, D und K konnte lediglich im Bereich des Verdünnungseffektes (Pufferzugabe) registriert werden. Für Daunomycin wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungseffektes eine Absenkung um 29 % bestimmt.

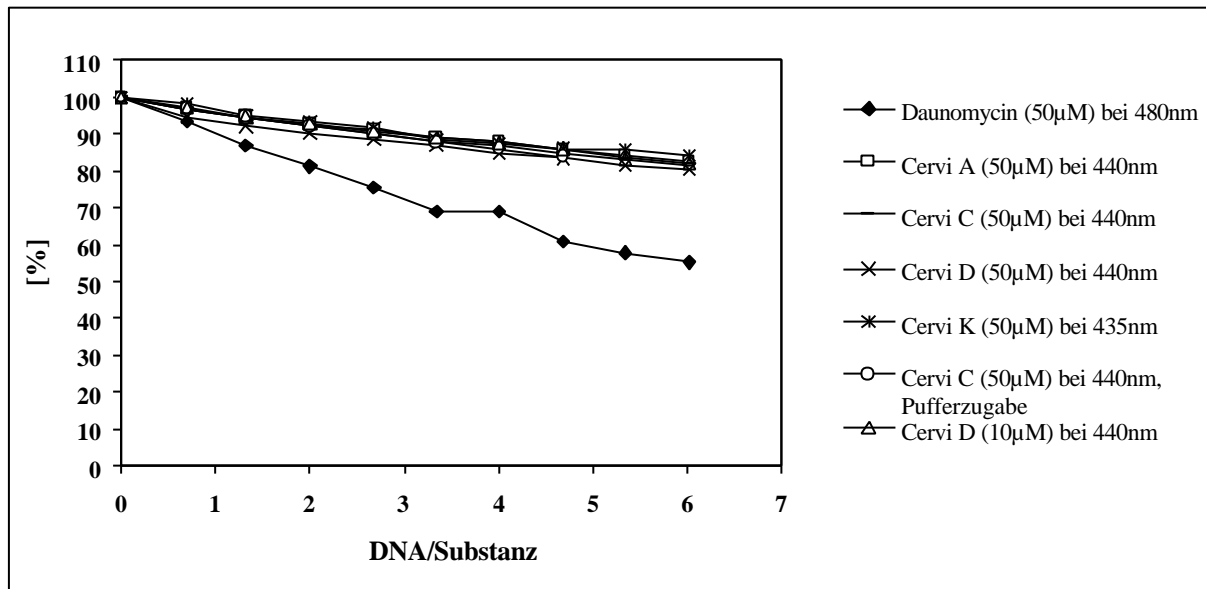


Abb. 38 Relative Absenkung der Absorption unter steigender DNA-Konzentration.

3.7.8.2 Metaboliteneinbautest: Aktivitätsstudien in intakten Zellen

Der Metaboliteneinbautest, der in Kooperation mit der Firma Bayer durchgeführt wurde, diente zur Untersuchung von Effekten auf die DNA-, RNA-, Protein- oder Zellwandbiosynthese als typische Angriffspunkte antibiotischer Wirkung. Dabei wird allgemein der hemmende Einfluss auf den Einbau von Biosynthesevorstufen in Makromoleküle erfasst. Das Target verschiedener Antibiotika für die Inhibition einer Makromolekülsynthese kann dabei unterschiedlich sein. So führen zum Beispiel DNA-Polymerase- und Topoisomerase II-Hemmung bzw. DNA-Interkalation gleichsam zur Hemmung der DNA-Replikation.

Die Verzögerung eines dieser Biosynthesevorgänge hat Auswirkungen auf alle anderen zellulären Funktionen, so dass nach dem Primäreffekt zeitverzögert eine Hemmung der anderen Makromolekülsynthesen auftreten kann, wie am Beispiel des Transkriptionsinhibitors Rifampicin dargestellt ist (**Abb. 39**). Die Kurvenverläufe aller Syntheseprozesse geben somit Rückschlüsse auf den antibiotischen Primäreffekt, dessen Inhibition zuerst auftritt. Nach dessen Kenntnis können spezielle Enzymtests oder genetische Targetuntersuchungen (rekombinante DNA-Methoden) folgen.

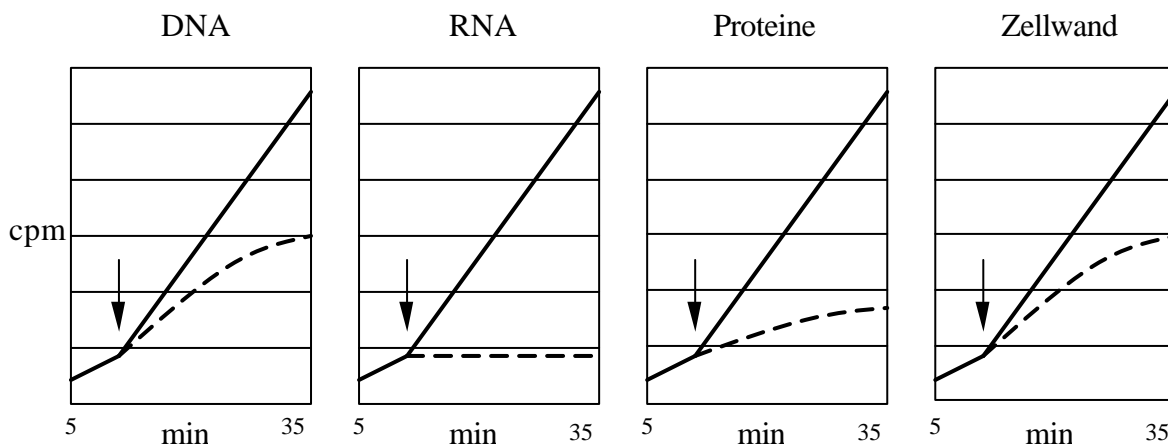


Abb. 39 Einfluss der Makromolekülbiosynthese durch Rifampicin mit RNA-Synthesehemmung als Primäreffekt (Schema; nach Lancini et al, 1995).

Auch weniger spezifische Aktivitäten, wie Membraninteraktionen oder Blockade der ATP-Synthese durch Wirkung auf respiratorische Funktionen, sind erkennbar, wenn das resultierende Ungleichgewicht im Haushalt essentieller Zellbestandteile bzw. der Verlust des für alle Makromolekülsynthesen notwendige ATP zu einem spontanen Zusammenbruch der Produktion aller Makromoleküle führen (Lancini et al., 1995).

Test:

Es wurde die Makromolekülsyntheseleistung von *Bacillus subtilis* 168 unter Einfluss der Cervimycine A und C zu unterschiedlichen Konzentrationen ($\frac{1}{4}$ x MHK, 1 x MHK, 4 x MHK und 8 x MHK) gemessen. Die Syntheserate konnte mit ^3H -markierten Biosynthespezifischen Präkursoren (Thymidin für DNA, Uridin für RNA, Leucin für Proteine, Glucosamin für Zellwand) in Messung der Radioaktivität der letztlich ins Makromolekül eingebauten Metabolite verfolgt werden (s. Kap. 5.12).

Ergebnisse:

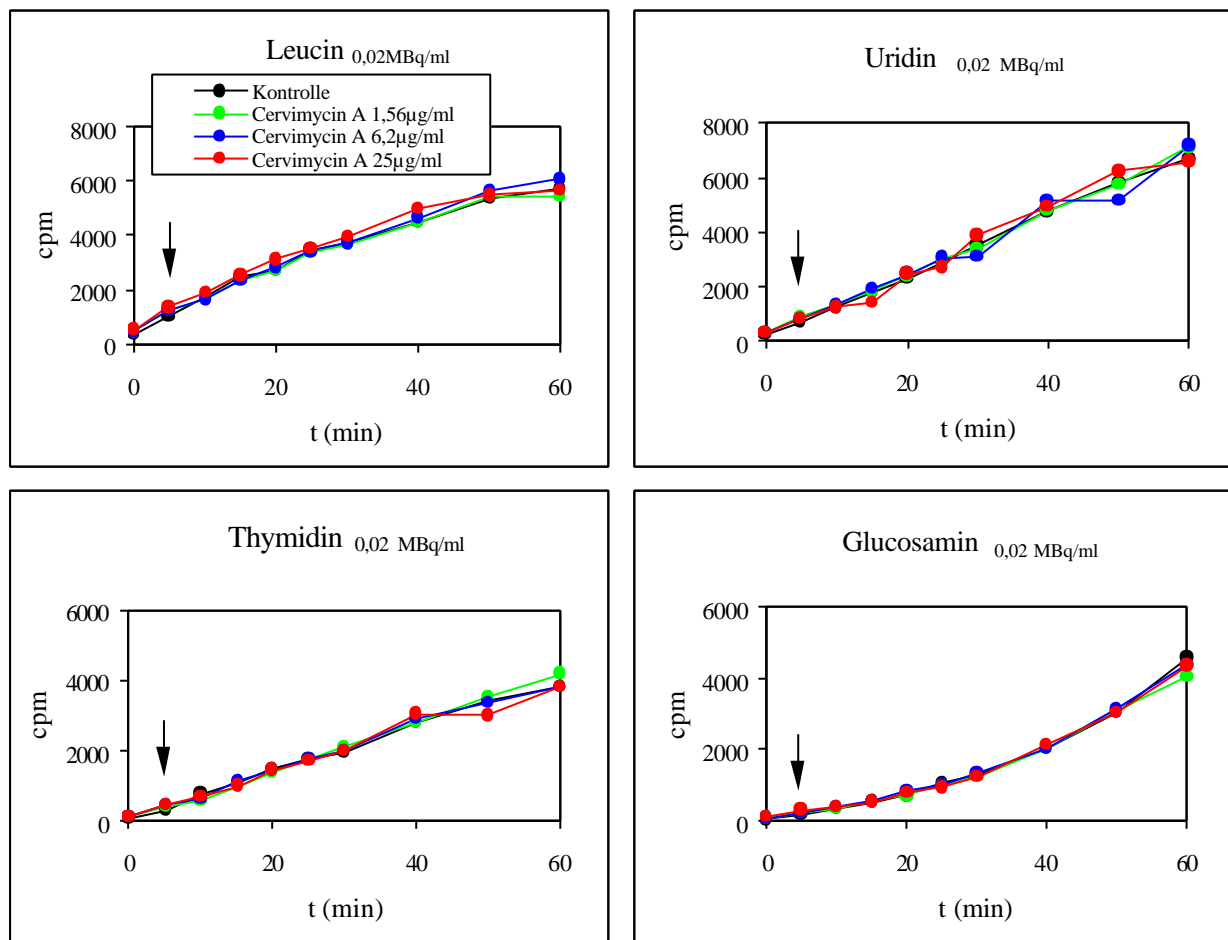


Abb. 40 Metaboliteinbautest: Untersuchung der Einbaurate von ^3H -Präkursoren in Makromoleküle unter Zugabe verschiedener Konzentrationen an Cervimycin A [1,56 µg/ml, ($\frac{1}{4}$ MHK), 6,2 µg/ml (1 x MHK), 25 µg/ml (4 x MKH)].

In den Kurvenverläufen der Cervimycine A (Abb. 40) und C (Abb. 41) im akzeptablen Konzentrationsbereich waren vergleichsweise zur unbehandelten Kontrolle keine Effekte auf alle Makromolekülbiosynthesen im Zeitrahmen der ersten Zellzyklen zu erkennen.

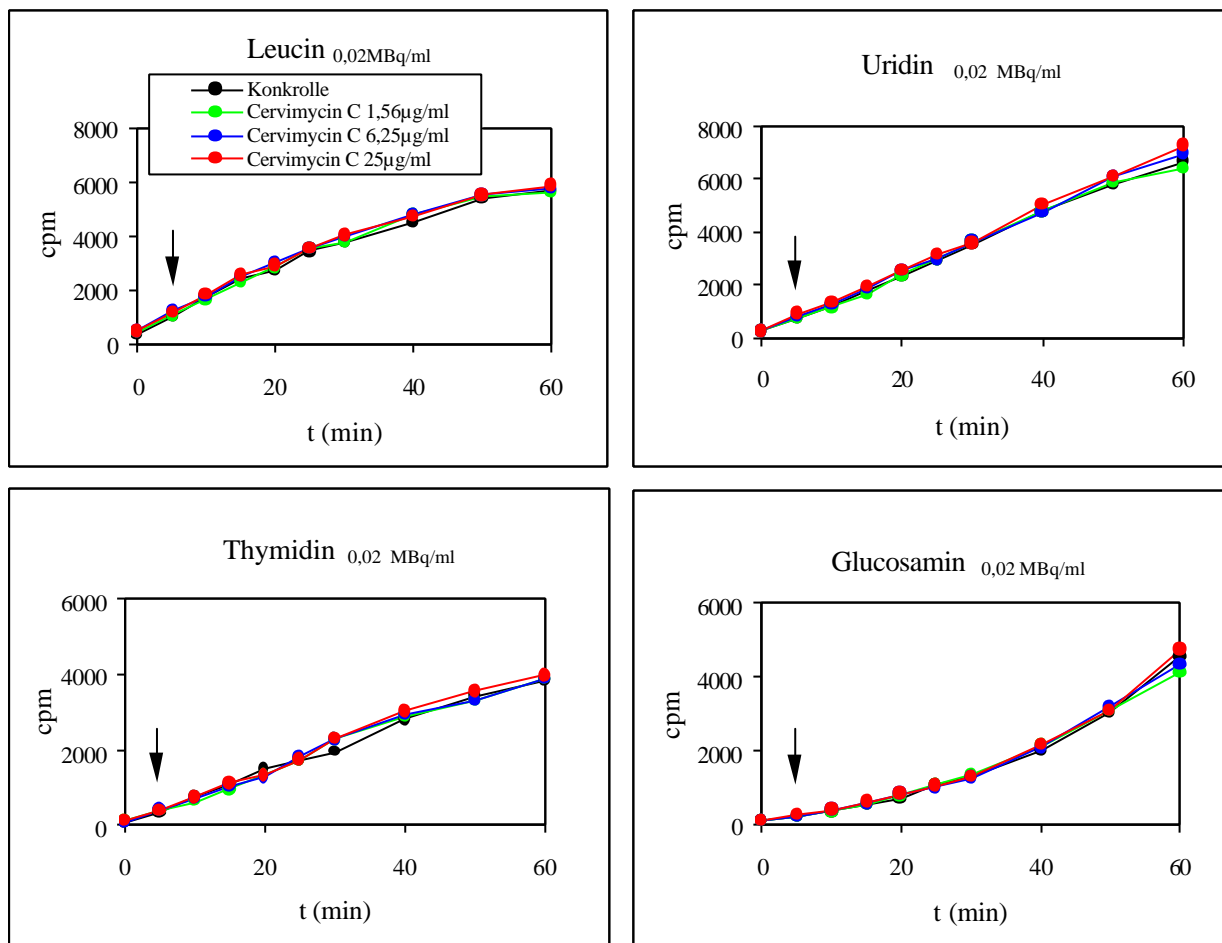


Abb. 41 Metaboliteneinbautest: Untersuchung der Einbaurate von ^3H -Präkursoren in Makromoleküle unter Zugabe verschiedener Konzentrationen an Cervimycin C [1,56 µg/ml, (1/4 MHK), 6,2 µg/ml (1 x MHK), 25 µg/ml (4 x MKH)].

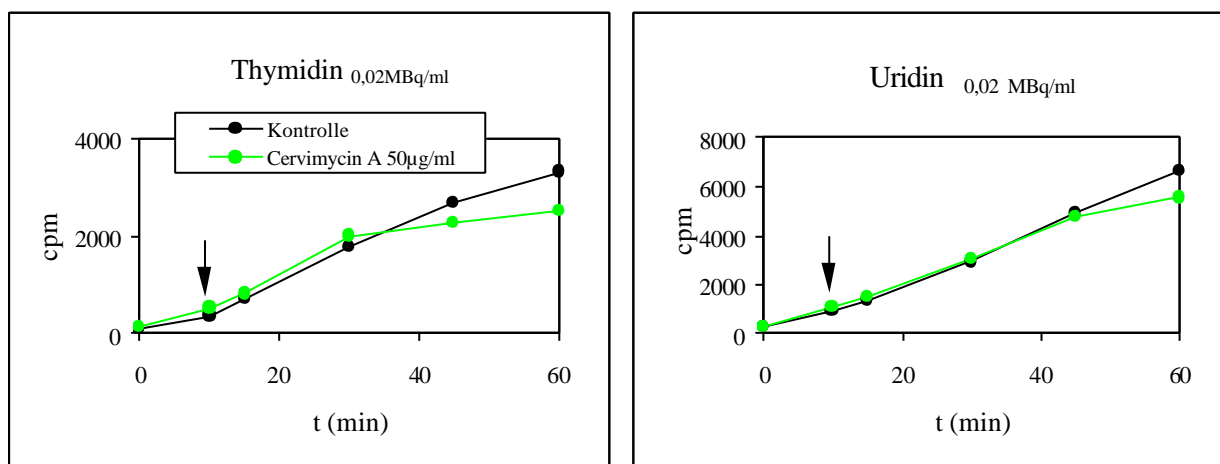


Abb. 42 Metaboliteneinbautest: Untersuchung der Einbaurate von ^3H -Präkursoren in Makromoleküle unter Zugabe einer Cervimycin A-Lösung von 50µg/ml (8 x MHK).

Erst eine erhöhte Dosierung mit einer Annäherung an zytotoxische Verhältnisse (50 µg/ml) beider Cervimycine zeigte, wie in **Abb. 42** für Cervimycin A dargestellt, eine leichte Beeinträchtigung der DNA- und RNA-Synthese. Beide Effekte traten dabei sehr stark zeitverzögert auf, wobei die Hemmung der DNA-Biosynthese etwas eher einsetzte (nach ca. 35 min) als die der RNA (nach ca. 45 min). Die Protein- und Zellwandsynthese unterlagen keinen Veränderungen.

Für hohe Cervimycinkonzentrationen wurde daher eine primäre Inhibition der DNA abgeleitet, die sekundär eine Hemmung der RNA-Synthese nach sich zog. Ob es sich dabei um Ereignisse bereits toxischer Effekte handelte, konnte in diesem Zusammenhang nicht geklärt werden.

3.8 Diskussion zur biologischen Testung der Cervimycine

Die antibakterielle Testung erbrachte eine erfolgreiche Bilanz für die Cervimycine. Außerdem kann eine leichte Unterstützung der Phagozytenaktivität durch alle getesteten Cervimycine verzeichnet werden. Eine auffällig antivirale Wirkung, Antitumoraktivität, entzündungshemmende Effekte, Radikalfängereigenschaften bzw. die Hemmung Sauerstoffradikalbildender Enzyme wurden im Rahmen der erfolgten Tests für die untersuchten Cervimycine nicht registriert.

3.8.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen in der antimikrobiellen Testung

Die Homologie der Cervimycine bietet eine optimale Voraussetzung zur Interpretation von Struktur-Wirkungsbeziehungen.

Aus der Unwirksamkeit der sogenannten „kleinen“ Cervimycine, dazu gehören die Aglyka E und F und die Cervimycine G, M, H und I mit einer, drei oder vier Hexosen, konnte abgeleitet werden, dass die Präsenz aller sechs Tridesoxyhexosen für die Wirkung obligatorisch ist. Ebenfalls ohne Wirkung blieben die Cervimycine J und L ohne Bisglykosylseitenkette in C-12a des Aglykons. Dies bestätigte nochmals beide Saccharidseitenketten als pharmakophore Gruppen. Gleiches kennt man auch von Anthracyclinen, deren Aglyka wenig wirksam oder völlig unwirksam sind, die aber unter Glykosylierung mit Aminosuktern ihre Wirkpotenz erhalten. Jedoch ist hierbei oftmals eine einfache Substitution ausreichend.

Der Austausch des Carbamoylrestes durch Acetyl in C-2 des Aglykons der Cervimycine zeichnet sich nur bei den Staphylokokken und somit keimabhängig durch eine verbesserte Wirkung aus, und eine geringfügige Strukturänderung der veresterten Dimethylmalonsäure unter Abspaltung einer Methylgruppe (Monomethylmalonsäure) vermittelt in der Cervimycin C-Gruppe (C-2 Carbamoyl) eine leichte Wirkungssteigerung.

Cervimycin K, das durch den Verlust der gesamten Dicarbonsäure gekennzeichnet ist, stellt die optimale Wirkstruktur dar. Es ist bis zu achtmal stärker aktiv gegen multiresistenten *Staphylococcus aureus* 134/94 und viermal besser wirksam gegen vancomycinresistenten *Enterococcus faecalis* 1528 als die zweitpotenteste Substanz Cervimycin D. Mit der hohen biologischen Aktivität, speziell in der Überwindung der Vancomycinresistenz und den Wirkvorteilen im Vergleich zu kommerziell genutzten Antibiotika unter Berücksichtigung seiner moderaten Zytotoxizität, stellt Cervimycin K eine überaus kompetente Substanz zur Entwicklung einer neuen pharmazeutischen Leitstruktur dar und wird diesbezüglich Gegenstand weiterführender Arbeiten sein.

Die von Momose et al. (1998^{b)}) veröffentlichten MHK-Werte von $< 0,2 \mu\text{g/ml}$ des Polyketomycins gegen multiresistente Staphylokokken zeigt das erhebliche Potential dieser Strukturklasse. Da dem Polyketomycin das Glykosid in C-12a-Stellung fehlt, könnte man eine maßgebliche Wirkbeteiligung der CH_3 -Gruppe in C-6 vermuten. Jedoch ist es fraglich, ob das gleiche Wirkprinzip für die wirksamen Cervimycine und das Polyketomycin vorliegt, vor allem da für Polyketomycin eine zytotoxische Tendenz nachgewiesen wurde. Es wäre somit interessant, in Veränderungen des gemeinsamen Aglykons bzw. in Variation der Seitenketten das Struktur-Wirkpotential näher zu untersuchen.

3.8.2 Aussagen zum Wirktarget der Cervimycine - Betrachtung der Ergebnisse der antibakteriellen Testung gegen Keime mit definierter Tetracyclinresistenz und der Targettests

Die Wirksamkeit der Cervimycine A, B, C, D, K und der Cervimycin C und A-methylester gegen die *tet* (L)- bzw. *tet* (M) / *tet* (L)-Isolate beweist, dass kein aktiver Auswärtstransport über den Mechanismus der Tetracyclin-Effluxresistenz erfolgt und die Tetracyclin-Targetresistenz durch die Cervimycine umgangen wird. Die MHK-Werte der Hauptkomponenten für die ribosomalen Proteinsyntheseinhibition (Kap. 3.7.1) zeigt, dass die Cervimycine nicht in der Lage sind, wirkeffektiv an Ribosomen zu binden, was auf ein anderes Target als das der Tetracycline und anderer ribosomaler Proteinsyntheseinhibitoren (z.B. Macrolide) schließen lässt. Im speziellen Vergleich der Struktur-Wirkungsbeziehung zu den engverwandten Tetracyclinen fehlt den Cervimycinen die Dimethylaminogruppe in C-4, die den Angriff der Tetracycline an die ribosomale 30 S-Untereinheit wesentlich mitbestimmt. Des Weiteren ist die Cervimycinwirkung von den Hexosen der voluminösen Seitenketten abhängig, die für die nicht-glykosylierten Tetracycline irrelevant sind. Durch diese strukturelle Inkompatibilität kann der Angriff der Cervimycine an einem anderen Wirktarget zumindest ansatzweise erklärt werden.

Aus der Unwirksamkeit im Interkalationstest ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Präsenz eines starren koplanaren Dreiringsystems (Ring B, C, D) in den Cervimycinen fehlt, welches für die interkalierende Wirkung der Anthracycline Priorität hat. Andere DNA-Wechselwirkungen sind jedoch für die Cervimycine durchaus möglich.

Da für die Cervimycinwirkung typische Antibiotikargets in den Untersuchungen der initialen Hemmung der Biosynthese von Makromolekülen nachweislich ausgeschlossen werden konnten, ergibt sich ein interessanter Ansatzpunkt zur Überwindung bestehender Resistenzen durch die Cervimycine im Angriff an neuen oder bisher unbekannten Targets.

3.9 Biosyntheseuntersuchungen der Cervimycine

Die therapeutisch nutzbare Wirkung des Cervimycin K war ein motivierender Beweggrund, tiefgreifendere Erkenntnisse über die Biosynthese der Cervimycine zu gewinnen, die als zweckgebundene Basis weiterführender Arbeiten dienen sollen. Die Cervimycine bieten die Grundlage zur Entwicklung neuer wirksamer Antibiotika über gezielte kombinatorische Biosynthese oder Mutasyntese. Auch besteht die Möglichkeit der Entwicklung einer Mutante, die zur Produktion ausschließlich des hochwirksamen Cervimycin K befähigt ist, und deren Fermentationsoptimierung zu einer Erhöhung der Ausbeute führt. Um diese Ziele als wesentlichen Beitrag zur Entwicklung neuer Wirkstoffe umsetzen zu können, müssen biosynthetische Zusammenhänge geklärt sein. Zu diesem Zweck wurden Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten Präkursoren durchgeführt und die Enzyme zur Cervimycinbiosynthese in molekularbiologischen Arbeiten beleuchtet.

3.9.1 Fütterungsversuche mit ^{13}C -markierten Biosynthesevorstufen

Fütterungsvorversuche

Für aromatische Polyketide, wie im Fall der Cervimycinaglyka, war die Biosynthese aus kleinen Fettsäureeinheiten, wie Acetat, Propionat oder Malonat, die beiden letzteren auch für die Synthese der Dimethylmalonsäure, anzunehmen. Die Biosynthese der 2,3,6-Tridesoxyhexosen war aus dem Katabolismus von D-Glucose zu erwarten.

Um die Akzeptanz des Stammes *Streptomyces tendae* HKI1079 8/2000 gegenüber den zuzufütternden Metaboliten einschätzen zu können, wurden vorerst Malonsäure, Na-Propionat Na-Acetat, L-Methionin und D-Glucose unmarkiert in Bolus oder sukzessiv zu verschiedenen Zeiten (Pulse-Feeding) der Fermentation hinzugegeben, und die Cervimycin C-Konzentration quantitativ mittels analytischer HPLC (Kap. 5.16.3) bestimmt.

Bei der Fütterung von Na-Acetat als auch Na-Propionat war keine Cervimycin C-Produktion zu verzeichnen, was entweder mit einer Hemmung der Sekundärmetabolitenbildung oder unzureichender Aufnahme der nicht an CoA-gebundenen Biosynthesevorläufer in die Zelle zu begründen war. L-Methionin, Malonsäure und D-Glucose ergaben keine Probleme und für Malonsäure ging sogar eine Anregung der Cervimycin C-Bildung hervor. Daher wurden 2- ^{13}C -Malonsäure, 1,3- $^{13}\text{C}_2$ -Malonsäure, 1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ -Malonsäure, L-Methionin-methyl- ^{13}C und U- $^{13}\text{C}_6$ -D-Glucose mittels Pulse-Feeding-Methode, welche sich gegenüber der Einmalzugabe durchsetzte, zur Markierung verwendet. Die Untersuchungen erfolgten entsprechend Kap. 5.13.

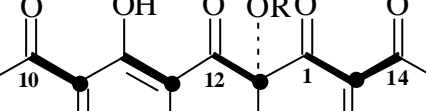
Ergebnisse des ^{13}C -Labelings

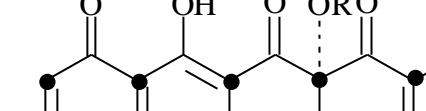
Die wichtigsten Daten des erfolgreichen Einbaus der ^{13}C -Präkursoren sind in **Tab. 8** zusammengefasst, in der die markierten Kohlenstoffe hervorgehoben sind.

Tab.8 ^{13}C -Markierungsergebnisse im Aglykon und der Dicarbonsäure von Cervimycin A, C und D.

C-Atom	% ^{13}C (1)	% ^{13}C (2)	% ^{13}C (3)	% ^{13}C (4)	% ^{13}C (5)	$^1J_{\text{cc}}$ [Hz] (5)
Aglykon						
1	0,62	0,75	10,84	1,01	14,88	62,2 (C-2)
2	16,90	8,16	1,42	0,96	10,57	62,2 (C-1) 62,8 (C-14)
3	0,63	0,65	10,83	1,02	13,22	45
4	5,27	7,14	1,28	1,00	12,22	45
4a	0,63	0,96	14,77	0,83	12,56	35
5	7,98	6,67	1,52	0,80	14,58	35
5a	0,58	0,77	14,4	1,07	14,09	57
6	6,17	8,02	1,02	0,97	13,90	57
6a	0,78	1,06	8,60	1,11	13,51	56
7	9,28	12,77	0,55	1,48	16,43	56
8	0,46	1,05	11,03	1,36	13,83	71
9	6,25	7,80	1,10	1,10	12,78	71
10	0,77	0,89	9,44	1,14	12,46	55
10a	12,78	11,0	0,63	1,15	15,27	55
11	1,22	0,89	10,98	1,11	13,86	68
11a	5,90	8,50	0,54	1,28	14,65	68
12	0,57	0,77	9,75	0,98	13,49	45
12a	13,52	8,61	0,47	1,04	15,60	45
13	0,83	0,94	10,13	1,13	1,10	-
14	1,10	0,99	3,88	77,14	15,11	62,8 (C-2)
15	7,69	-	-	-	-	-
Dicarbonsäure	DMMS	DMMS	MMMS	DMMS	-	-
1'	1,04	1,04	0,86	1,12	-	-
2'	0,99	0,99	0,82	1,12	-	-
3'	1,11	1,11	1,00	1,22	-	-
4'	1,04	1,04	0,49	1,05	-	-
5'	0,71	0,71	-	0,80	-	-

MMMS Monomethylmalonsäure; DMMS Dimethylmalonsäure; (1) 2- ^{13}C -Malonsäure in Cervimycin A; (2) 2- ^{13}C -Malonsäure in Cervimycin C; (3) 1,3- $^{13}\text{C}_2$ -Malonsäure in Cervimycin D; (4) L-Methionin-methyl- ^{13}C in Cervimycin C; (5) 1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ -Malonsäure in Cervimycin C.

a) 

b) 

intaktes Malonyl intaktes Acetyl ● 2-¹³C-Malonat Δ Methyl

69

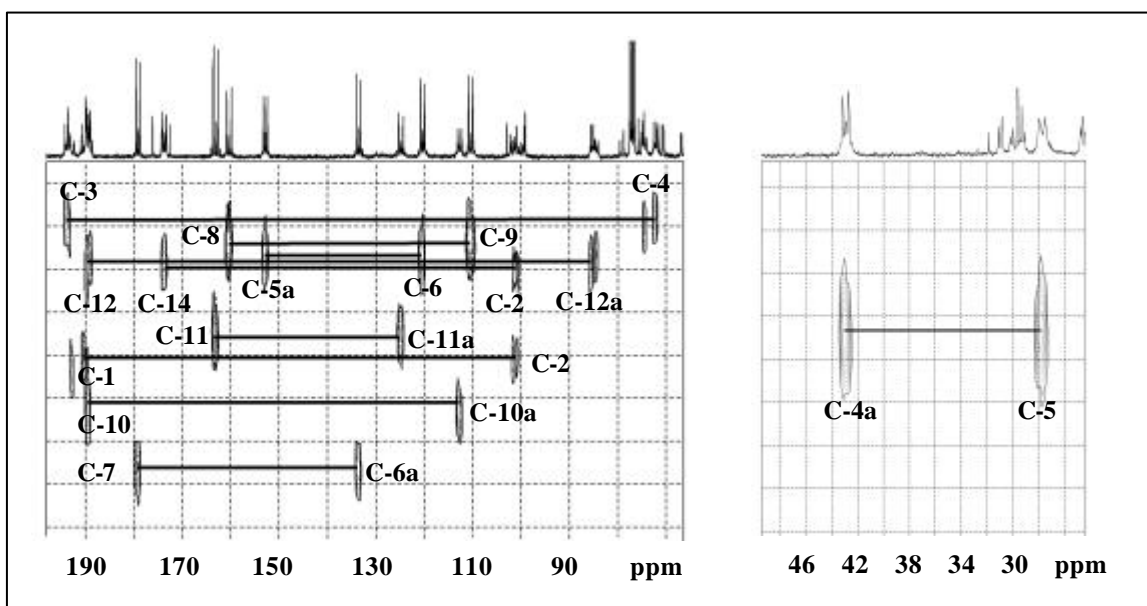


Abb. 44 Ausschnitt aus dem INADEQUATE Spektrum des Cervimycin C nach Markierung mit 1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ -Malonsäure: sichtbare ^{13}C -Kopplungspartner im Aglykon.

Die starken Überlagerungen der NMR ^{13}C Signale in den Hexosen im markierten Cervimycin C aus dem Fütterungsansatz mit uniform markierter D-Glucose ließen erwartungsgemäß keine Integration der Peakflächen der ^{13}C -Signale zu, wodurch auch keine Festlegung der ^{13}C -Inkorporationsraten und der genauen ^{13}C ,C Korrelationen möglich war. Jedoch konnte aus dem typischen Aufspaltungsmuster der J_{cc} -Kopplungen der NMR Signale markierter Kohlenstoffe mit jeweils zwei weiteren ^{13}C -markierten Nachbarn, wie in Abb. 45 am Beispiel der C-4 und C-5 der Hexosen zu erkennen, die Biosynthese der 2,3,6-Trideoxyhexosen aus dem Glucosegrundgerüst geschlussfolgert werden.

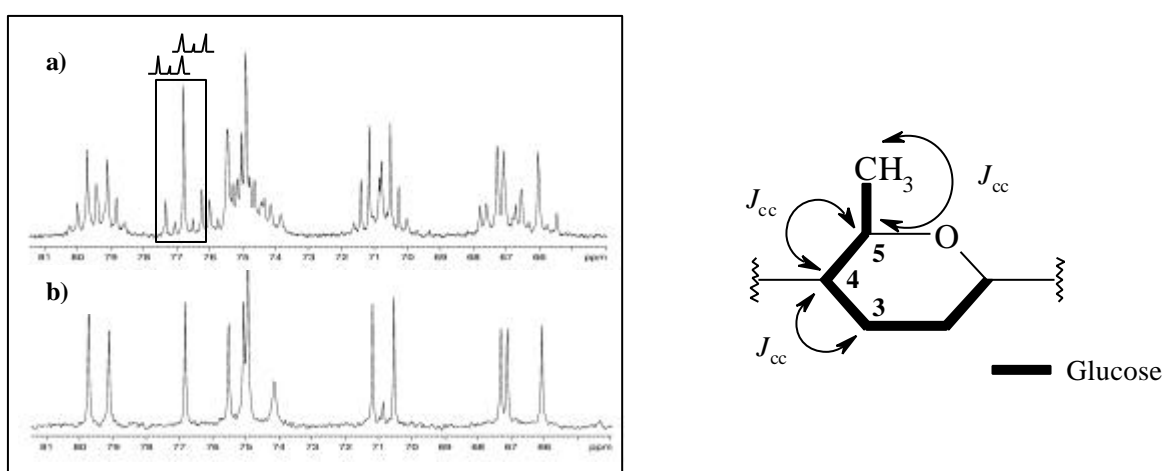


Abb. 45 ^{13}C NMR Spektren des Cervimycin C im Bereich der C-4 und C-5 der Hexosen, a: ^{13}C Spektrum nach Einbau uniform markierter Glucose; b: unmarkiertes ^{13}C Spektrum.

Der Ursprung einer terminalen monoveresterten Dimethylmalonsäure wurde bisher noch nicht untersucht. Einige Polyketide, wie Epothilon (Gerth et al., 2000.), Resistomycin (Höfle et al., 1983) oder Benastatin (Aoyama et al., 1992) enthalten integrierte geminale Dimethylgruppen, die durch Methylierung oder Bismethylierung aus Methylmalonat bzw. Malonat entstehen, eine Reaktion, die sich nach dem Malonyltransfer ereignet.

In den Fütterungsexperimenten des Cervimycin C mit markiertem ^{13}C -Methionin wurde, wie in **Tab. 8** erkennbar, nur die O-Methylierung in Position C-8 des Aglykon detektiert und in keinem Fall der Malonsäurefütterung fand ein Einbau von Malonat in die Dimethylmalonsäure statt. Somit konnte klar geschlussfolgert werden, dass die Dimethylmalonsäure weder aus Malonat, noch aus Methylmalonat synthetisiert wurde. Auch der Methylmalonsäureester in Cervimycin D ging nicht aus Malonsäure hervor, wie durch Fütterungsexperimente mit 1,3- $^{13}\text{C}_2$ -Malonsäure gezeigt werden konnte (**Tab. 8**).

Aus diesen Ergebnissen wurde für die Synthese der Dimethylmalonsäure der Einbau einer intakten geminalen Dimethyleinheit angenommen.

3.9.2 Nachweis zur Biosynthese der Dimethylmalonsäure

Als einen alternativen Biosyntheseweg der Dimethylmalonsäure könnte die Carboxylierung von Isobutyrat angesehen werden. Solche verzweigten Carbonsäuren, die als Startereinheiten der Fettsäuresynthasen (Kaneda, 1991) und der Polyketidsynthasen (Moore und Hertweck, 2002) dienen, werden im bakteriellen Metabolismus durch den Abbau verzweigter Aminosäuren, wie Leucin, Isoleucin und Valin über die entsprechenden α -Ketosäuren gebildet (Hafner et al., 1991; Omura et al., 1991). Die dem Isobutyrat vorausgehende Aminosäure Valin wurde als Vorstufe in Form von d_8 -L-Valin der Fermentation des *Streptomyces tendae* HKI 0179 8/2000 in gleicher Weise wie die ^{13}C -Vorstufen zugefüttert. Die Analyse fand mittels MS Spektroskopie statt (Kap. 5.17.2).

Trotz einer relativ geringen Inkorporationsrate von 9,4 % zeigten vergleichende ESIMS und ESIMSⁿ Studien des nativen und markierten Cervimycin C (**3** und d_6 -**3**), dass die Dimethylmalonsäure tatsächlich aus L-Valin biosynthetisiert wurde. d_8 -L-Valin wurde mit einem Verlust von zwei Masseinheiten eingebaut, was im ESIMS mit einer Differenz von M+6 des Pseudo-Molekülions des d_6 -Cervimycin C mit 1256 gegenüber 1250 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ für Cervimycin C angezeigt wurde (**Abben. 46, 47**).

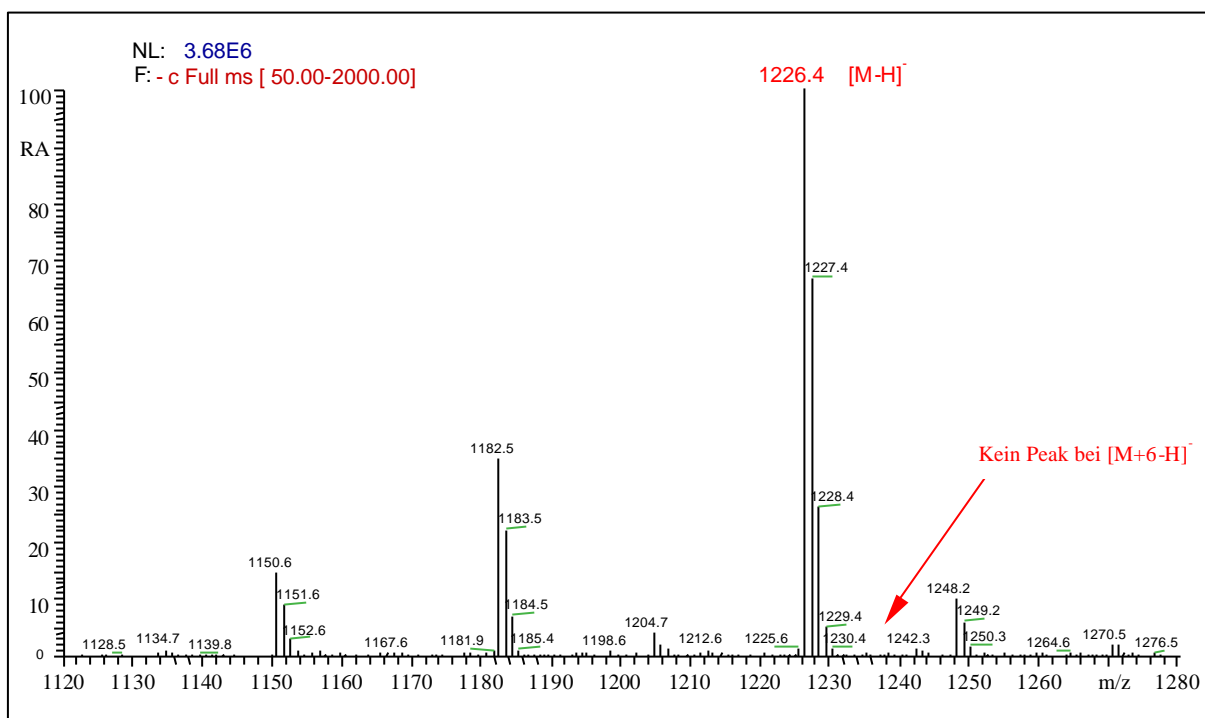


Abb. 46 ESIMS Spektrum (Negativmodus) des nativen, unmarkierten Cervimycin C (3).

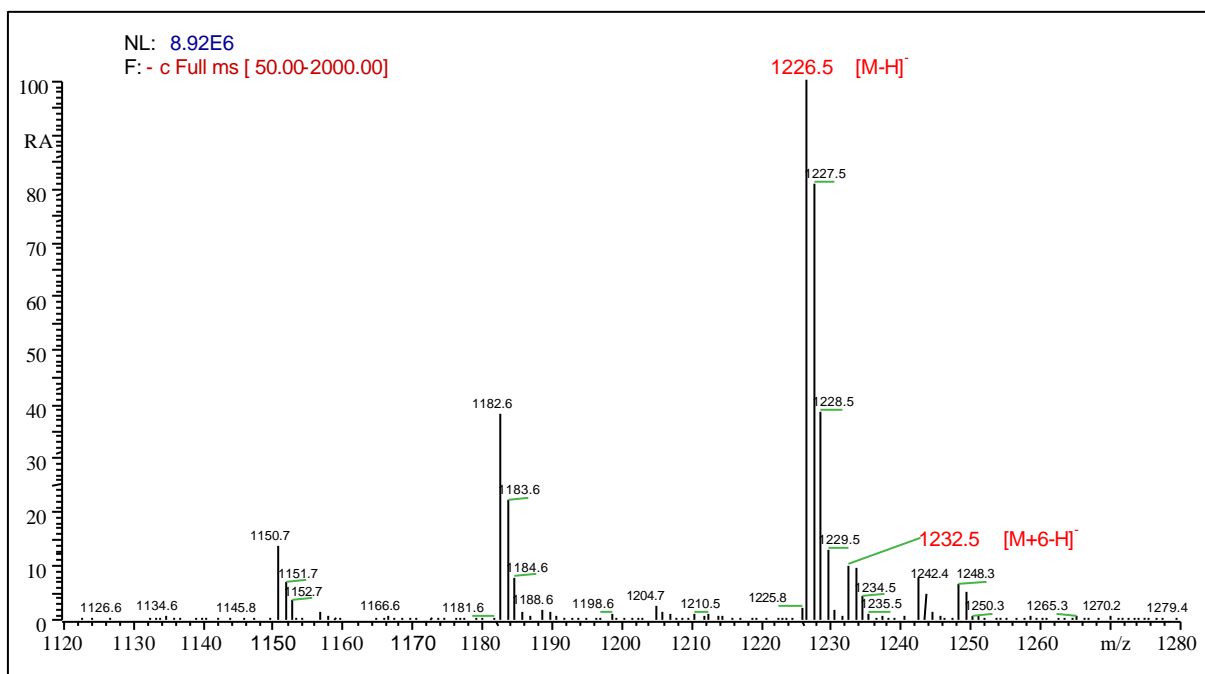


Abb. 47 ESIMS Spektrum (Negativmodus) des d_6 -gelabelten Cervimycin C (d_6 -3) nach Markierung mit d_3 -L-Valin.

In Betrachtung der Pseudo-Tochterionen beider Substanzen (Spektren im Anhang) im ESIMSⁿ konnte die *d*₆-Markierung innerhalb der Dimethylmalonsäureeinheit zweifelsfrei belegt werden. Während das Dimethylmalonsäure-tragende Tetrasaccharidfragment mit [M+Na]⁺: 593 (**3**) / 599 (*d*₆-**3**) den M+6-Masseunterschied aufwies, war das komplementäre Strukturfragment, bestehend aus Aglykon und zwei Tridesoxyhexosen, mit [M+Na]⁺: 680 für beide identisch (**Abb. 48**).

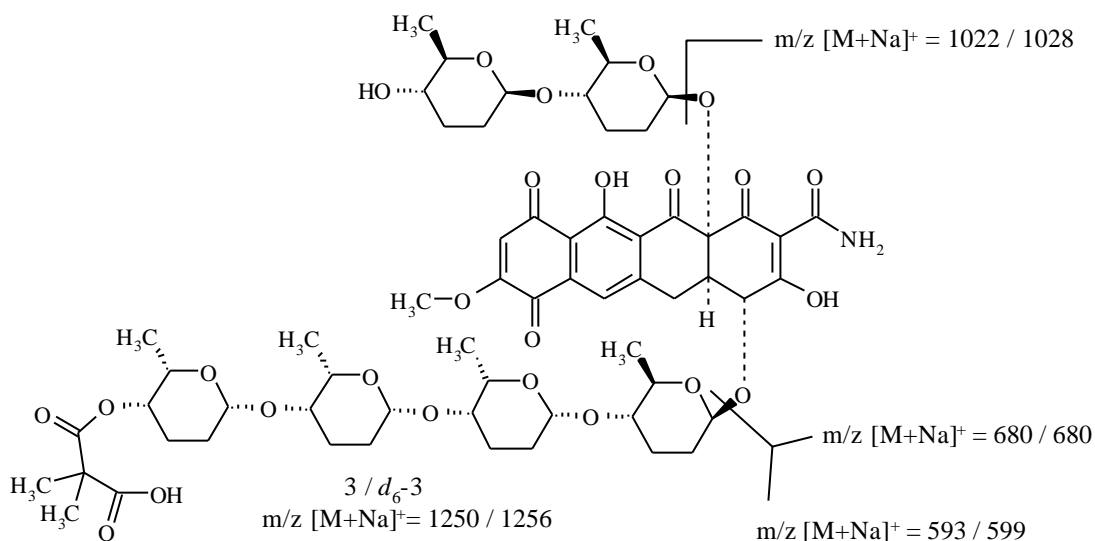


Abb. 48 Ergebnisse der MSⁿ-Experimente für Cervimycin C und *d*₆-Cervimycin C.

Der Verlust der beiden Deuteriumatome aus dem *d*₈-L-Valin deckte sich darüber hinaus perfekt mit dem vorgeschlagenen Transaminierungs-Decarboxylierungs-Schema des Aminosäureabbaus (Hafner et al., 1991; Omura et al., 1991). Dieser war für das markierte L-Valin zum Einbau in die Dimethylmalonsäure folgendermaßen denkbar:

Das erste Deuterium wird während der durch die Aminosäuretransaminase katalysierte Transaminierung und damit einhergehende Dehydrierung in C-2 in Entstehung von *d*₇-Ketoisovaleriat abgespalten. Die anschließende oxidative Decarboxylierung von *d*₇-Ketoisovaleriat, vermittelt durch den α -Ketosäure-Dehydrogenasekomplex, führt zum Thioester, der nachfolgend einer Carboxylierung in C-2 unter Verlust des zweiten Deuteriums unterliegt. Das *d*₆-Dimethylmalonyl-CoA kann im Anschluss mit einer speziellen Acyltransferase auf die Tetrasaccharidseitenkette der Cervimycine übertragen werden (**Abb. 49**).

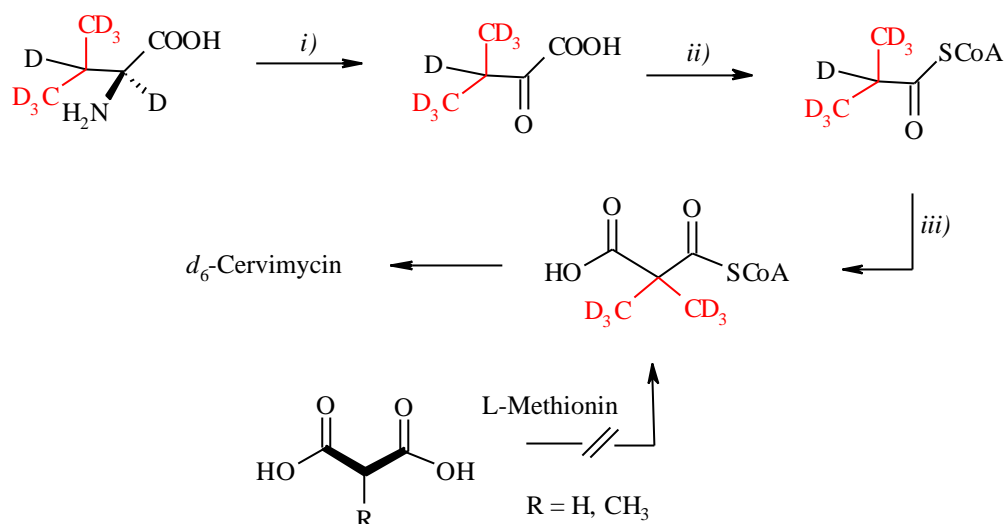


Abb. 49 Vorschlag zur Biosynthese der Dimethylmalonsäure aus L-Valin, i) Transaminierung; ii) Ketothiolation - Decarboxylierung; iii) Carboxylierung; Methylgruppen nicht aus L-Methionin.

3.9.3 Untersuchungen zur molekularen Basis der Cervimycinbiosynthese

3.9.3.1 Allgemeines zu Typ II PKS in der Biosynthese von aromatischen Polyketiden

Polyketidsynthasen (PKS) sind allgemein die Schlüsselenzyme für die Generierung von Polyketiden. Sie zeigen starke Sequenzhomologien und Ähnlichkeiten in der enzymatischen Reaktionsfolge zu den Enzymen und Mechanismen der Fettsäuresynthese. Die Klassifizierung der bakteriellen PKS erfolgt in Analogie zu den Fettsäuresynthasen auf Grund ihrer Funktionalität in Typ I PKS und Typ II PKS (Anderson et al., 2000). Zudem gibt es eine dritte bakterielle PKS-Gruppe, die mit der pflanzlichen PKS verwandt ist, zu der es bisher aber nur wenige Informationen gibt (Funa et al., 1999). Allen PKS gemein ist die Verknüpfung von aktivierten Acyl-CoA-Einheiten über Claisen-Kondensation zu β -Keto-Intermediaten. Post PKS-Reaktionen, zum Beispiel Hydroxylierung, Methylierung, Oxidationen und Reduktionen sowie Glykosylierung, bewirken unterschiedlichen Strukturveränderungen des Polyketidkörpers und bestimmen die weitreichende Strukturdiversität (Anderson et al., 2000).

PKS vom Typ II bestehen aus mehreren individuellen Proteinen, die iterativ genutzt werden und Bestandteile eines funktionellen Komplexes bilden. Aus den primär gebildeten β -Keto-Ketten entstehen durch Zyklisierung und Dehydratisierung multizyklische aromatische Polyketide. Die sogenannte Minimal-PKS, die erstmals in der Arbeitsgruppe von Hopwood durch die Pionierarbeiten am Biosynthese-Gencluster von Actinorhodin gefunden wurde, besteht aus einem Acylcarrierprotein (ACP), der Ketosynthase α (KS_α) und der

Ketosynthase β (KS_{β}), die auch als Kettenverlängerungsfaktor (CLF) bezeichnet wird (McDaniel et al., 1994^a), 1994^b; Fu et al., 1994; Kramer et al., 1997). Die Determination der Kettenlänge erfolgt jedoch in Kooperation von KS_{β} und KS_{α} (Shen et al., 1995). Leadlay leitete außerdem eine Decarboxylaseaktivität für KS_{β} ab, die für die initiale Umwandlung der ersten Malonat-Einheit zu Acetat verantwortlich ist (Bisang et al., 1999). Obwohl die meisten aromatischen Polyketide mit Acetat als Startereinheit aufgebaut werden, gibt es verschiedene andere Typ II PKS, die andere Starter, wie Malonat, Malonamat, Propionat oder Benzoat verwenden und vom primären klassischen Decarboxylierungsmechanismus abweichen. So sind in Oxytetracyclin (Malonamat) und Enterocin (Benzoat) eine monofunktionale CoA Ligase und eine Acyltransferase an der Aktivierung und dem Transfer des Starters beteiligt. Die molekularen Zusammenhänge in der Wahl des Starters aromatischer PKS sind bislang noch nicht vollständig geklärt (Moore und Hertweck, 2002). Gleiches gilt für die Kontrolle der Kettenlänge, der Faltung und der Abgabe des vollständig aufgebauten Moleküls aus dem Enzymkomplex. Untersuchungen in dieser Hinsicht ergaben, dass eine komplexe Assoziation von vielen Proteinen für eine effektive und kontrollierte Wirksamkeit der Typ II PKS notwendig ist.

3.9.3.2 Die Lokalisation der Cervimycin-Typ II PKS

Die Arbeiten zur Lokalisation der Cervimycin-Polyketidsynthase wurden in Zusammenarbeit mit der Nachwuchsgruppe Bioorganische Synthese des HKI durchgeführt.

Identifikation der KS_{α}

Da es sich bei den Cervimycinen um aromatische Polyketide handelt, wurde eine Polyketidsynthase Typ II für die Biosynthese angenommen.

An Hand der Homologie der Untereinheit KS_{α} der Cervimycin (*cer*)-PKS zu der spezieller Tetracyclimbildner sollte die Polyketidsynthase lokalisiert werden. Unter Verwendung der genomischen DNA des *Streptomyces tendae* HKI0179 8/2000 als Template und dem Einsatz hochspezifischer degenerierter Primer wurde die *cer* KS_{α} mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Entwicklung der Primer *cer*-F1, *cer*-F2, *cer*-R1 und *cer*-R2 (**Tab. 9**) erfolgte an Hand hochkonservierter Motive der KS_{α} von *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albobacillus* und *Streptomyces aureofaciens* (GenBank Eingangsnummer: P43678, BAA92277 und BAB12566). Unter Verwendung von *cer*-F1 und *cer*-R2 wurde durch PCR ein DNA-Fragment von 0,8 kb erfolgreich amplifiziert und mit Hilfe des pGEM-T Easy Vector Systems kloniert und sequenziert. Dabei offenbarte sich eine hohe Homologie der erhaltenen

Aminosäuresequenz zu KS $_{\alpha}$ -Sequenzen der Datenbank, insbesondere zu der von *Streptomyces albobacens* (Übereinstimmungen = 79%, Positive = 89%). Zum Nachweis der KS $_{\alpha}$ als Subeinheit der *cer* TypII PKS und der Beteiligung an der Cervimycinbiosynthese wurde das 0,8 kb-große KS $_{\alpha}$ -PCR-Produkt weiterverwendet.

Tab.9 Nukleotidsequenzen der verwendeten degenerierten Primer.

Primer	Nukleotidsequenz
cer-F1	(5'-ATGACSATSAGYCTSGACCG-3'),
cer-F2	(5'-ACTTCGTSCCSTCSTCSATGG-3'),
cer-R1	(5'-GSAGSGAGTGKCCGATCATSC-3'),
cer-R2	(5'-AGSGGSACGTAGTCSAGG-3').

S = G oder C; *K* = G oder T; *Y* = C oder T

Funktionsbeweis der Cervimycin-Polyketidsynthase

Das erhaltene PCR-Produkt (0,8 kb) konnte genutzt werden, um die KS $_{\alpha}$ im nativen Stamm *Streptomyces tendae* HKI0179 8/2000 auszuschalten.

Das 0,8 kb-Fragment wurde dafür mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI ausgeschnitten und in die *Eco*RI-Schnittstelle des Suizidvektors pOJ260 (mit Apramycin-Resistenzkassette) ligiert (Bierman et al., 1992). Danach erfolgte die Inaktivierung der KS $_{\alpha}$ durch homologe Rekombination. Die DNA des resultierenden Plasmides pXU01 wurde denaturiert und in *Streptomyces tendae* HKI0179 8/2000 durch Polyethylenglykol-induzierte Protoplasten-transformation übertragen (Kieser et al., 2000). Durch Selektion mittels Apramycinresistenz konnte die positive Mutante *S. tendae* HKI0179::pXU01 gefunden werden. Ihre Präsenz wurde indirekt durch die Detektion der in PCR-Amplifikation gewonnenen Apramycin-Resistenzkassette der genomischen DNA der Mutante im Vergleich zur Positivkontrolle (pOJ260) und Negativkontrolle (genomische DNA von *S. tendae* HKI0179 8/2000) bekräftigt (Abb. 50).

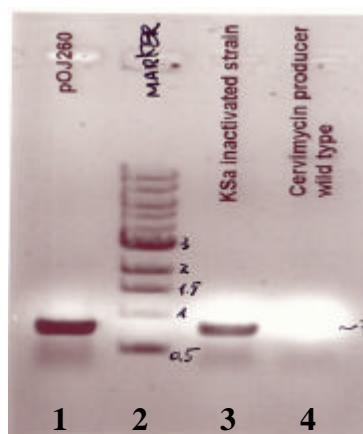


Abb. 50 Indirekter Nachweis der erfolgreichen Inaktivierung der KS $_{\alpha}$ durch Detektion der Apramycin-Resistenzkassette im Vektor pOJ260 und der Mutante *S. tendae* HKI0179::pXU01; 1: pOJ260, 2: Marker, 3: Mutante, 4: *S. tendae* HKI0179 8/2000.

Die HPLC-Analyse (Kap. 5.16.3) des Extraktes, welches durch die Fermentation der Mutante *Streptomyces tendae* HKI0179::pXU01 (Kap. 5.14) gewonnen werden konnte, zeigte eindeutig, dass dieser Stamm nicht in der Lage war, weder die Cervimycine der Gruppe A noch der Gruppe C zu produzieren (**Abb. 51**). Es bestätigte zum einen die erfolgreiche Ausschaltung der KS $_{\alpha}$ als Bestandteile der Cervimycin-PKS und somit die Auffindung des richtigen Genclusters und bewies zum anderen, dass beide Cervimycinaglyka über das gleiche Biosyntheseenzym unter Verwendung verschiedener Startereinheiten gebildet wurden.

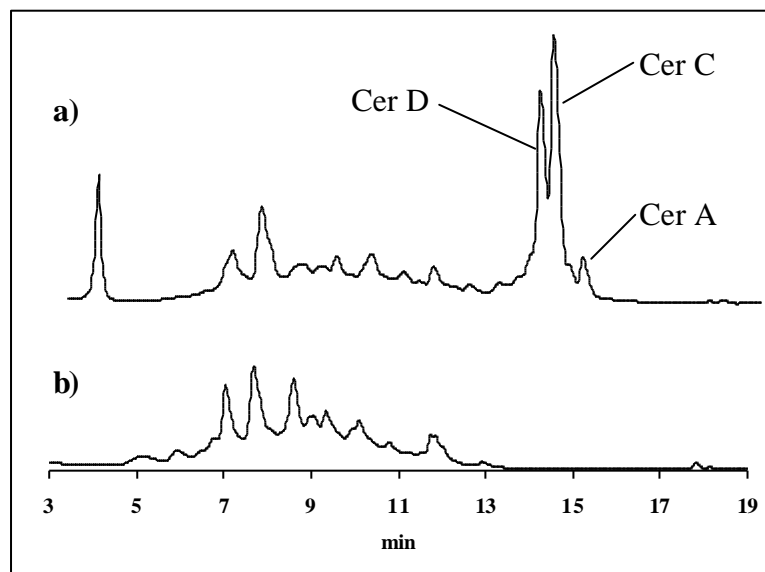


Abb. 51 HPLC-Profil ($\lambda = 436\text{nm}$) der Extrakte von *S. tendae* HKI0179 8/2000 (a) und der Mutante *S. tendae* HKI0179::pXU01 (b).

3.9.3.3 Klonierung der *cer* Typ II PKS

Um für die Klonierung der *cer* PKS (meist 3-4 kb) eine aufwendige Genbank zu umgehen, wurde versucht, durch Verdau der DNA der in KS $_{\alpha}$ -augeschalteten Mutante *Streptomyces tendae* HKI0179::pXU01 mit einem Restriktionsenzym, welches außerhalb der flankierenden Regionen zum integrierten Vektors pOJ260 schneidet, die PKS-Gene zu erhalten. Dazu sollte das Prinzip des DNA-Recovery zu Nutze gemacht werden.

Versuche mit der Nuklease *Nde* I blieben ohne Erfolg. Jedoch konnte durch Verdau der isolierten Mutanten-DNA mit der Nuklease *Asc* I und anschließender Religierung der verdauten DNA Plasmide gewonnen werden, von denen nach Transformation und anschließender Apramycinselektion (Apramycinresistenzkassette des integrierten Vektors) ein Klon mit einer Plasmid-DNA der maximalen Größe von 12 kb gefunden wurde (s. Kap.

5.15.1-5, Kap. 5.15.9). Der Anteil der genomischen DNA betrug ca. 8,5 kb, ausreichend Material, um die Gene der PKS abzudecken. Mit der 12 kb-DNA wurde eine Shotgunbibliothek hergestellt, um ein Screening der Plasmidklone durchzuführen. Die gewonnenen 1-2 kb-großen DNA-Segmente wurden in den pBluescript-Vektor II SK (+) ligiert (Kap. 5.15.6.; 5.15.7). Die nachfolgende Transformation der erhaltenen Plasmide erbrachte in Blau/Weiß-Selektion 192 Shotgunklone (Kap. 5.15.4 und 5), von denen für 96 eine Sequenzierung stattfand (Kap. 5.15.8). Dabei konnten 73 verwertbare Sequenzen erhalten werden, die nach Auswertung und Vektorbereinigung in Contigs eingegliedert wurden. Über Datenbanksuche (NCBI blastx) wiesen die Konsensussequenzen eines Contigs (ca. 6 kb) starke Homologien zu Proteinsequenzen der KS α und des ACP in *Streptomyces rimosus* und der KS β in *Streptomyces aureofaciens* auf, womit die erfolgreiche Klonierung der *cer* PKS bewiesen wurde (**Abb. 52**).

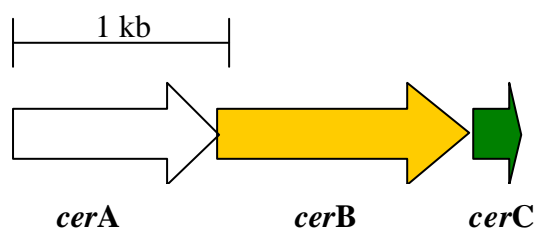


Abb. 52 Schematische Darstellung der *cer* Minimal PKS II.

Die wichtigsten Informationen über die Gene der Cervimycin-PKS sind in **Tab. 10** zusammengefasst und die Nukleotid- und Proteinsequenzen im Anhang aufgeführt.

Tab.10 *cer* Gene der Cervimycin-Minimal-PKS in alphabetischer Reihenfolge, ihre korrespondierende Proteingröße, die Enzymfunktion und die höchste Homologie.

Protein	Größe [AS]	Funktion	Höchste Homologie			
			Protein	Stamm	Identitäten/ Positive [%]	Protein- nummer
CerA	313	KS α	ORF 1	<i>S. rimosus</i>	79/87	CAA80985.1
CerB	405	KS β	TcsE	<i>S. aureofaciens</i>	70/81	AB039379.1
CerC	91	ACP	ORF 3	<i>S. rimosus</i>	51/71	CAA80986.1

AS = Aminosäuren.

3.10 Diskussion zu Biosynthese der Cervimycine

3.10.1 Faltung und Substitution

Die Biosynthesewege des Cervimycin C-Aglykon als C-19-Kohlenstoffgerüst über den klassischen Weg der Tetracyclimbiosynthese und des Cervimycin A-Aglykons als C-20-Kohlenstoffgerüst können wie in **Abb. 53** dargestellt, angenommen werden.

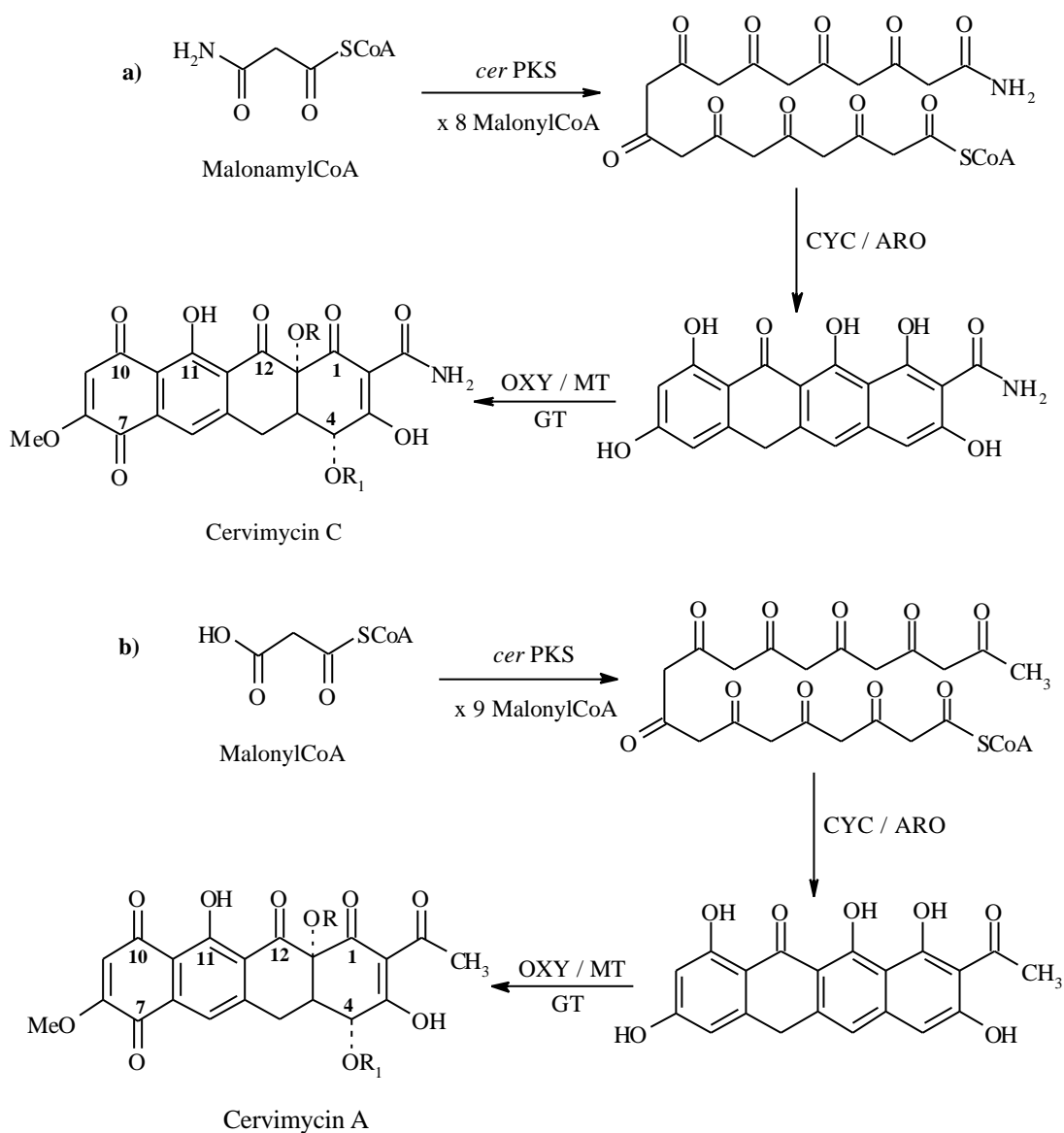


Abb. 53 Biosynthese des Cervimycin C- (a) und Cervimycin A-Aglykons (b); ARO: Aromatase, CYC: Cyclase, GT: Glykosyltransferase, OXY: Oxygenase, MT: Methyltransferase.

Beide durchlaufen die typische Streptomyces-(S)-Typ-Polyketidfaltung der Poly- β -Ketokette im Vergleich zu dem fungalen (F)-Typ, wie es für das Mycotoxin Viridicatumtoxin beschrieben wurde. Dieses in verschiedenen Penicilliumarten gebildete Produkt (Kabuto et

al., 1976; Thomas, 2001) ist wie andere aromatische Polyketide aus Pilzen von chemotaxonomischen Interesse (**Abb. 54**).

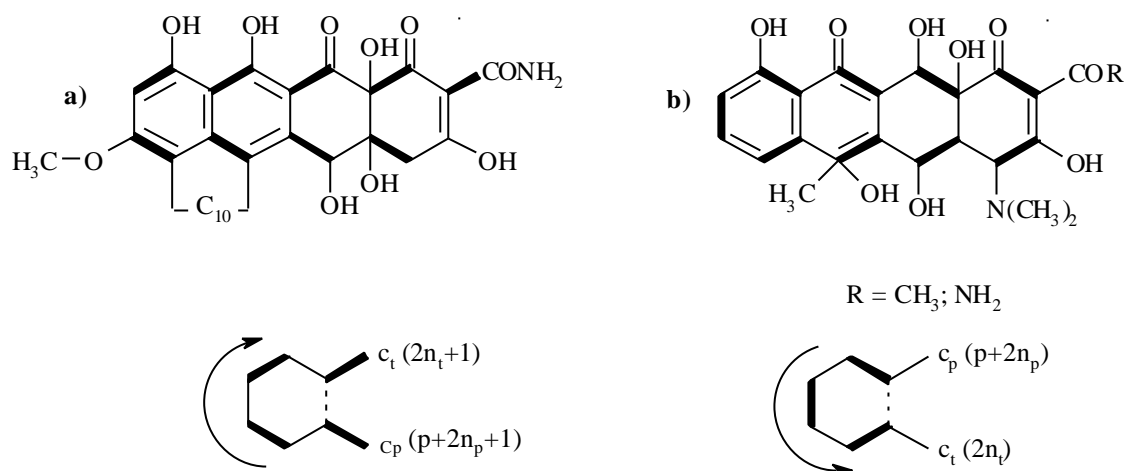


Abb. 54 Gegenüberstellung der Polyketidfaltmuster vom F-Typ im Viridicatumtoxin (a) und S-Typ in Tetracyclinen (b; CONH_2 = Oxytetracyclin, COCH_3 = Acetyldecarboxamidooxytetracyclin) unter Acetateinbau; c_p und c_t : beginnende und terminale Seitenkette; p : Primereinheit; n_p und n_t : Anzahl intakter C_2 -Einheiten.

Die biosynthetische Klassifizierung der in filamentösen Bakterien und in Pilzen gebildeten aromatischen Polyketide auf Grund verschiedener archetypischer Faltmodi basiert auf der Regioselektivität der Aldolverknüpfung in Entstehung des initialen Cyclohexanringes. Während durch die F-Faltung der Cyclohexanring aus zwei Acetateinheiten aufgebaut wird, entsteht unter S-Faltung der erste Ring aus drei intakten C_2 -Einheiten (**Abb. 54**). In Konsequenz resultieren *ortho*-ständige Seitenketten mit Faltmuster-spezifischer Anzahl an Kohlenstoffatomen. In der Regel sind pilzliche aromatische Polyketide aus einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffen und solche aus Streptomyceten aus einer geraden Kohlenstoffanzahl in den Seitenketten aufgebaut. Die Cervimycine wiesen eindeutige S-Faltung auf.

Die gebildeten Cervimycinaglyka unterliegen zahlreichen sekundären Modifikationen. Dazu gehören eine O-Methylierung in Position 8, Oxygenierungen in C-4, 7, 12a, Glykosylierungen mit den Tridesoxyzuckern in Verknüpfung mit O-4 und O-12a und der Acylierung mit der Dicarbonsäure in C-4 der Hexose D. Enzymatisch können dafür eine O-Methyltransferase, Monooxygenasen, Glykosyltransferasen und eine spezielle Acyltransferase angenommen werden. Die Methoxygruppe in C-8 der Cervimycine weist auf das Fehlen der für die Tetracycline typische Ketoreduktaseaktivität hin. Vergleichbares kennt man zum Beispiel für das zytostatische Tetracenomycin (**Abb. 55**). Dessen Biosyntheseenzyme weisen keine Ketoreduktase auf, jedoch enthält es eine bifunktionale Tcm-Cyclase/O-Methyltransferase,

die u.a. für die C-3 O-Methylierung (in Analogie der C-8-Position der Cervimycine) verantwortlich ist (Hutchinson et al., 1995). Ähnliches wäre somit für die Entstehung der Cervimycine denkbar.

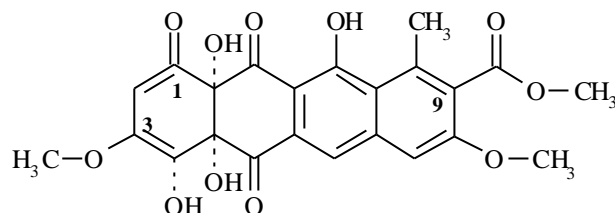


Abb. 55 Tetracenomycin C (Tcm C).

Der Einbau der Tridesoxyhexosen in die neue Strukturklasse ist ein besonderes Merkmal gegenüber den Tetracyclinen, obgleich die in jüngster Zeit isolierten tetracyclinverwandten Dactylocycline (Devasthale et al., 1992) den Einbau eines Aminoazuckers aufweisen. Auch für einige C-2-Acetylverbindungen, die nach dem Tetracyclinfaltmuster aufgebaut werden, wie die Chromocyclomycine (Berlin et al., 1968) konnten Glykosylierungen beobachtet werden. Die verschiedenen Cervimycine, die sich in der Anzahl der substituierten Hexosen unterscheiden, können am wahrscheinlichsten als Produkte der sequentiellen Glykosyltransferaseaktivität und somit als Intermediate der Cervimycin A, B, C bzw. D-Biosynthese angesehen werden. Jedoch kann eine Entstehung durch Cervimycinabbau durch den Produktstamm *S. tendae* HKI0179 oder in Hydrolyse durch die Aufarbeitungsbedingungen nicht ausgeschlossen werden.

3.10.2 Malonamat als Starter

Der Einbau einer intakten C-3-Einheit als Malonat oder Malonamat, wie für das Cervimycin C-Aglykon bestätigt wurde, ist vergleichsweise selten in Naturstoffen zu finden. Hierzu zählen die Tetracycline, das Cycloheximid (Jeffs et al., 1981; Shimada et al., 1981) oder Lysolipin (Bockholt et al., 1994). Ob es sich um eine Carboxamidogruppe als Startereinheit handelt oder ob die Einführung des Stickstoffs zu einem späteren Zeitpunkt der Biosynthese stattfindet, ist bisher umstritten. Thomas und Williams zeigten 1983, dass Oxytetracyclin aus Malonamyl-CoA als Starter aufgebaut wird. Gleichzeitig schlossen sie nicht aus, das Malonyl-CoA inkorporiert, welches nachfolgend aminiert wird. Die beste Indikation des Malonamats als Starter kommt von einer *Streptomyces rimosus*-Mutante. Diese wurde im *otcDI*-Gen ausgeschaltet, welches für die bifunktionale Cyclase/Aromatase kodiert, die wesentlich die schrittweise Faltung, Zyklisierung bzw. Aromatisierung des

Oxytetracyclinrückgrates mitbestimmt (Petkovic et al., 1999). Diese Mutante erzeugte kein Oxytetracyclin, dafür aber vier neue Polyketide von unterschiedlicher Kettenlänge und Faltmuster. Alle vier hatten amidierter Termini. Petkovic argumentierte, dass es unwahrscheinlich ist, dass diese verschiedenen Verbindungen alle Substrate eines einzelnen Enzyms sind, das nach der Formierung des Polyketidgerüsts für die Aminierung verantwortlich ist. Demzufolge ist der Malonamateinbau als gemeinsamer Primer die eindeutigere Erklärung. Die Arbeitsgruppe um Rohr, Floss und Mitarbeiter (Bockholt et al., 1994) untersuchten durch Inkorporationsstudien mit 1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ -Malonsäure die Biosynthese des zytotoxischen Xanthonderivates Lysolipin X und bewiesen Malonat als Starter. Die Insertion des im Heterozyklus des Endproduktes enthaltenen Stickstoffs könnte unter später Aminierung oder primären Malonamateinbau, äquivalent zum postulierten Schema der Tetracycline, erfolgen. Ein endgültiger Beweis für die Festlegung einer der beiden Vorgänge fehlte.

3.10.3 Der Einbau verschiedener Starter durch eine Polyketidsynthese

Die simultane Bildung der C-2-Acetyl-Cervimycine (Analoge der Gruppe A) und C-2-Carbamoyl-Cervimycine (Analoge der Gruppe C) im Extrakt des *S. tendae* HKI0179 8/2000 ist keine Besonderheit und bei den Tetracyclinen bereits bekannt. Hochstein und Wittenau (1960) fanden erstmals 2-Acetyl-2-decarboxamidooxytetracyclin (ADOTC) als Nebenprodukt des Oxytetracyclins, produziert von *S. rimosus*. Gleiches galt für 2-Acetyl-2-decarboxamidotetracyclin (ADTC) neben Tetracyclin aus *S. aureofaciens* (McCormick et al., 1962), sowie die Isolierung von ADTC und 2-Acetyl-2-decarboxamidochlortetracyclin (ADCTC) aus einer Mutante von *S. aureofaciens* (Miller et al., 1962). In verschiedenen Versuchen mit biochemischen Mutanten (Frolova et al., 1971) oder Veränderung der Fermentationsbedingungen (Markarevich et al., 1971) wurden die C-2-Acetylverbindungen sogar dominant produziert. Das Europäische Arzneibuch limitiert den Gehalt von C-2-Acetylverbindungen als Verunreinigungen in pharmazeutischen Tetracyclinzubereitungen zum Beispiel mit 2 % ADOTC in OTC-Formen (European Pharmacopoeia 4, 2002).

Repräsentative Beispiele auch aus Eukaryonten sind die Verbindungen TAN-1612 und TAN-1652 (**Abb. 56**) aus *Penicillium claviforme* (Ishimaru et al., 1994).

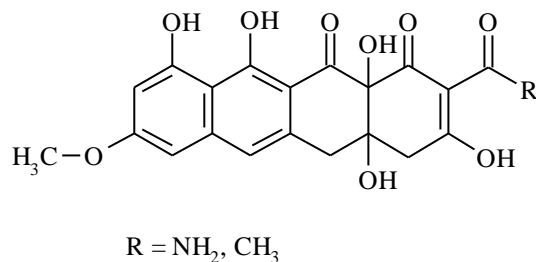


Abb. 56 TAN-1612 ($R = \text{CH}_3$) und TAN-1652 ($R = \text{NH}_2$) aus *Penicillium claviforme*.

Erste Hinweise auf den gleichen Biosynthesekomplex zur Produktion der Nona- und Dekaketiden erbrachte McCormick 1962 durch Zugabe von 2-Acetyl-2-decarboxamido-anhydrotetracyclin zu einer Kultur von *S. aureofaciens* S 2242, welche die Biosynthesevorstufe zu ADTC umsetzte. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Amidgruppe in C-2 keine notwendige Prämisse für die Biosynthesereaktionen ist, und dass die Produktion von ADTC vom identischen Synthasekomplex produziert wird, aus dem die Carboxamidderivate hervorgehen. Diese Aussage wurde später gestützt durch die Synthese von ADTC durch *S. aureofaciens* S 6422, einer Blockmutante, die, wie McCormick formulierte, zur Bildung von Malonamyl-CoA unfähig war.

Experimente mit vorläuferdirigierter Biosynthese konnten schon mehrfach beweisen, dass einzelne Polyketidsynthasen eine große Akzeptanz gegenüber einer breiten Palette an natürlichen, aber auch unnatürlichen Startereinheiten aufweisen können. Durch die gezielte Ausschaltung der *cer* Typ II PKS war der Nachweis des Einbaus der verschiedenen Starter Acetat und die intakte Malonateinheit in Analogie zu tetracyclinproduzierenden Synthasen möglich. Die geringere Konzentration an gebildetem Cervimycin A und dessen Analoga wird wahrscheinlich durch eine geringere Affinität der PKS zu Acetyl-CoA verursacht, welches erst nach Limitierung des Malonats (bzw. Malonamats) in der Kulturbrühe eingebaut wird.

3.10.4 Entstehung der Dimethylmalonsäure

Die Biosynthese der Dimethylmalonsäure über den Abbau von L-Valin war ein sehr überraschendes Ergebnis, erschien doch die Bismethylierung von Malonsäure naheliegender. Wenige prominente Beispiele in der Literatur beschreiben die Beteiligung verzweigter Fettsäuren an der Biosynthese verschiedener Strukturen unter Einbau der korrespondierenden α -Ketosäuren. So wird Avermectin unter Einbau verschiedener Starter, d.h. Isobutyryl-CoA aus L-Valin oder 2-Methylbutyryl-CoA aus Leucin (Cane et al., 1983; Denoya et al., 1995; Schulmann et al., 1986) biosynthetisiert und der ungewöhnliche 4-Methylvaleryl-CoA-Starter

in der Biosynthese des Tetrahydroanthracenonderivates R1128C verwendet (Marti et al., 2000). 4-Methylvaleryl-CoA wird dabei initial aus Isobutyrat in Kondensation mit einer Acetateinheit über die der Minimal-PKS vorgeschalteten Acyltransferase und KS β gebildet.

3.10.5 Die *cer* PKS

Mit der erfolgreichen Lokalisation und die Identifikation der *cer* PKS konnten die zentralen enzymatischen Schritte der Kondensation und des ersten Ringschlusses (Ring D) zum Aufbau des Cervimycingrundgerüsts nachgewiesen werden. Vergleiche mit den in der Literatur beschriebenen Biosyntheseclustern aromatischer Polyketide (**Abb. 57**) zeigen die Übereinstimmung in den Minimal PKS und der homologen Anordnung ihrer Untereinheiten. Die Mutantenbildung, die Klonierung und das Wissen um den Aufbau der Gene der *cer* PKS sind Ausgangspunkt zur Klärung des gesamten Cervimycin-Biosynthese-Genclusters und darauf aufbauenden Arbeiten.

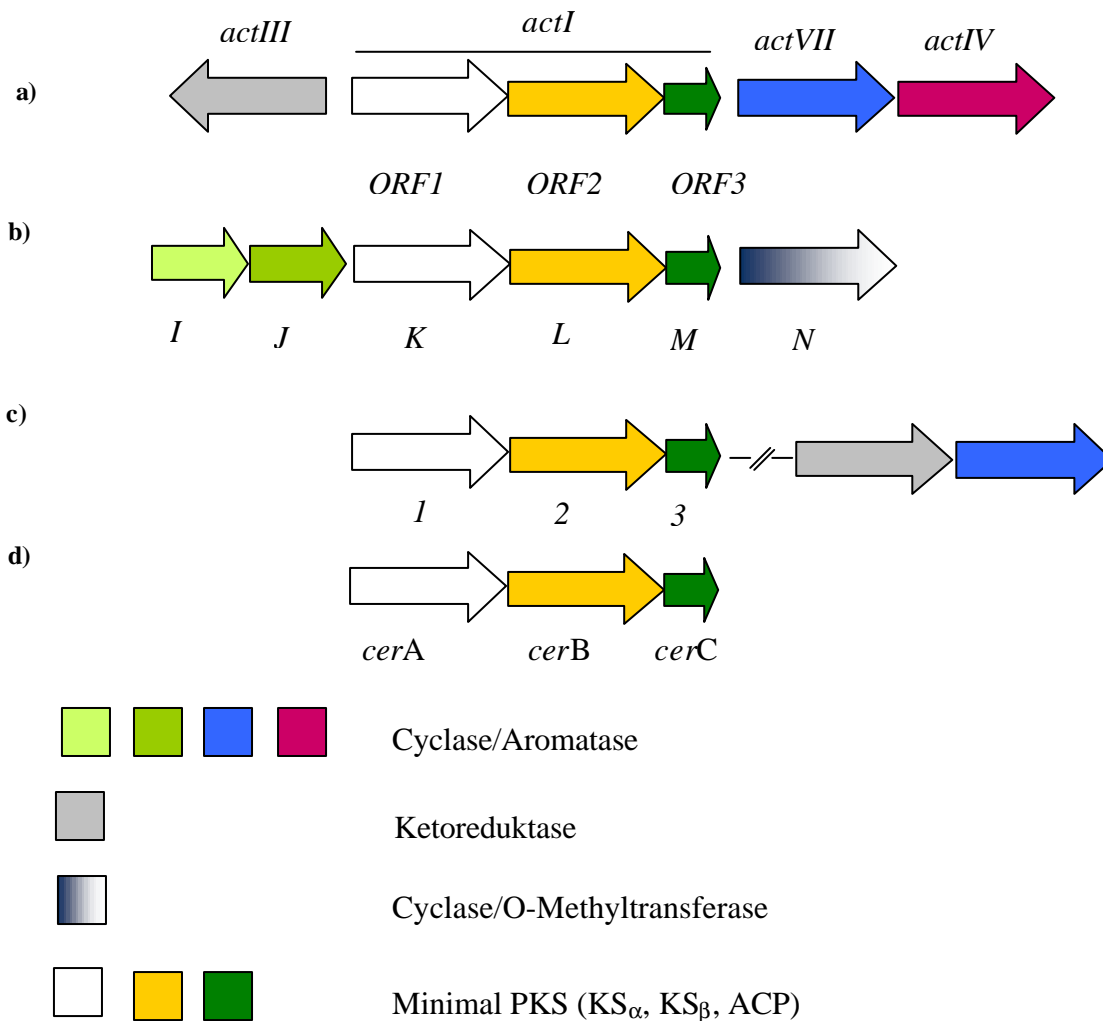


Abb. 57 Teile der Biosynthese-Gencluster von a: Actinorhodin; b: Tetracenomycin, c: Oxytetracyclin, d: Cervimycine (nach Staunton und Weissman, 2001).

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit beschreibt auf der Basis der Grundlagenforschung die Isolierung, Strukturaufklärung, biologische Aktivität, Struktur-Wirkungsbeziehungen sowie wesentliche biosynthetische Zusammenhänge einer Gruppe interessanter bioaktiver Sekundärmetaboliten aus Bakterien.

Mit dem Ziel, neue antibiotische Wirkstoffe in Mikroorganismen zu finden, wurden in vorangegangenen Arbeiten Extrakte verschiedener Actinomyceten, welche in steinzeitlichen Höhlen isoliert wurden, auf ihr antimikrobielles Spektrum hin untersucht. Im gezielten biologischen Screening konnte für ein Isolat eines Streptomyceten, der taxonomisch eine hohe Homologie zur Art *Streptomyces tendae* aufwies, eine verstärkte Wirkung gegen schwerwiegende nosokomiale Keime sowie verschiedene pathogene tetracyclinresistente Bakterien registriert werden.

Eine spezielle Isolierungsstrategie ermöglichte die Auftrennung des im HPLC- bzw. DC-Profil erkennbaren gelben Substanzkomplexes, welcher aus der Fermentation des relevanten *Streptomyces tendae* HKI0179 8/2000 hervorging. Die Cervimycine A, B, C, D, F, G, H, I, J und K konnten dabei als homologe Strukturen einer bisher wenig untersuchten Naturstoffklasse aromatischer Polyketide isoliert werden. Das Substanzspektrum wurde durch chemische Modifikation der fermentativ gewonnenen Hauptkomponenten A und C um die Cervimycine E, L, M und zwei Cervimycin-methylester erweitert. Durch NMR Studien war es erstmals möglich, alle NMR Shifts zu detektieren und vollständig zuzuordnen. Dadurch war in allen Verbindungen der tetracyclinähnliche Naphthacengrundkörper mit einer seltenen äußeren p-chinoiden Struktur nachweisbar und die Klärung des bis dahin nicht eindeutig identifizierten Ringes A im Aglykon möglich. Die in zwei Hauptgruppen eingeteilten Cervimycine in Unterscheidung der C-2-Stellung ihrer Aglyka differieren darüber hinaus in ihrem Substitutionsgrad mit 2,3,6-Tridesoxyhexosen, die als α -L-Rhodinose und β -D-Amicetose definiert werden konnten. Zusätzlich war für einige Cervimycine eine in der Natur einzigartige Veresterung mit Dimethylmalonsäure nachweisbar. Während für die Cervimycine C, D, F, G, H und J Übereinstimmungen mit Strukturen eines japanischen Patentes (Furui et al., 1994) recherchiert wurden, können die sieben Cervimycine A, B, E, I, L, M und K sowie die beiden synthetisierten Methylester als neue Verbindungen vorgelegt werden.

Für fünf Cervimycine wurden ausgeprägte biologische Aktivitäten gegen Gram-positive Bakterien, darunter im speziellen gegen klinisch relevante Nosokomialkeime, wie multiresistenten *Staphylococcus aureus* 134/94 und vancomycinresistenten *Enterococcus faecalis* 1528 sowie gegen Keime mit definierter Tetracyclinresistenz nachgewiesen. Die

beiden Glykosylseitenketten zeigten sich als pharmakophore Gruppen, die für eine effiziente Wirkung vollständig vorliegen müssen. Fehlt die Dicarbonsäure, liegt, wie im Fall des Cervimycin K, die Substanz mit der potentesten Aktivität vor, deren Wirkkonzentrationen gegen verschiedene Keime im therapeutischen Bereich angesiedelt sind. Weder waren DNA-interkalierende Effekte der Cervimycine vergleichsweise zu den verwandten Anthracyclinen nachweisbar, noch haben targetorientierende Untersuchungen gezeigt, dass ein für Antibiotika typischer Wirkort durch die wirksamen Cervimycine angegriffen wird. Es bestehen Hinweise auf ein bisher unbekanntes Target und somit ist eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung neuer Antibiotika gelegt.

Biosynthesestudien der Cervimycine durch Fütterungsversuche mit Vorläufern führten zu dem Ergebnis, dass die Aglykone über den Biosyntheseweg der aromatischen Polyketide durch Kondensation von Acetateinheiten aufgebaut werden. Dabei wird die Carbamidsubstruktur der Hauptkomponente Cervimycin C durch Einbau einer intakten C-3-Startereinheit (Malonat) in das Aglykon eingefügt, während bei der Hauptkomponente Cervimycin A Acetat als Starter fungiert. Erwartungsgemäß erwies sich die D-Glucose als Ausgangspunkt für die Biosynthese der sechs identischen 2,3,6-Tridesoxyhexosen. Die selten natürlich vorkommende Dimethylmalonsäureeinheit der Cervimycine A und C wird aus L-Valin generiert, wodurch die geminalen Methylgruppen unverändert eingebaut werden.

Molekularbiologische Arbeiten ermöglichten die Lokalisation und Identifizierung der *cer* Typ II PKS als wesentlichen Bestandteil der Biosyntheseenzyme zum Aufbau der Cervimycine, wobei ein und die selbe PKS unter Verwendung zweier variierender Starter sowohl 2-Carbamoyl- als auch 2-Acetyl-Cervimycin-Aglyka darstellen kann. Damit konnte ein essentieller Schritt der Aglykasyntese der Cervimycine aufgeklärt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine bedeutende Anzahl antibiotischer Verbindungen gewonnen werden, wobei sich Streptomyceten wieder einmal als unerschöpfliche Quelle bioaktiver Sekundärmetaboliten erwiesen. Es wurde der Weg zum Erhalt neuer Leitstrukturen von pharmazeutischem Interesse geebnet. Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen werden wissenschaftliche Projekte folgen, in denen das hochwirksame Cervimycin K Gegenstand weiterer Forschung sein wird. Die Suche des antibiotischen Targets, Untersuchungen zur Auswirkung auf humane Zellen, die Klärung des gesamten Biosynthese-Genclusters und Struktur-Wirkungszusammenhänge unter chemischer Modifikation der Cervimycine sind spannende und anspruchsvolle Herausforderungen zukünftiger Arbeiten.

5 MATERIALIEN UND METHODEN

5.1 Liste allgemein verwendeter Chemikalien und Reagenzien

1,2,3- ¹³ C ₃ -Malonsäure	Isotec (Miamisburg, OH, USA)
1,3- ¹³ C ₂ -Malonsäure	Isotec (Miamisburg, OH, USA)
2- ¹³ C-Malonsäure	Isotec (Miamisburg, OH, USA)
Acetanhydrid	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Agar	Difco Laboratories (Detroit, MI, USA)
Ammoniummolybdat	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Ammoniumacetat (Fractopur [®])	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Ammoniumsulfat	Laborchemie (Apolda)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Anisaldehyd	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Apramycin	Sigma (Deisenhofen)
Bacto TM Tryptone	Becton Dickinson (Sparks, MD, USA)
Bacto TM Yeast Extract	Becton Dickinson (Sparks, MD, USA)
<i>d</i> ₈ -L-Valin	Isotec (Miamisburg, OH, USA)
Daunomycin	HKI-Bestand
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Eisen(III)chlorid	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Eisessig	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Glucose (technisch)	Sabamühle (Nürnberg)
Glucose (wasserfrei)	Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
Hafermehl	Feldmühle (Göttern)
Hefe Extrakt KAT (technisch)	Ohly (Hamburg)
Kalbsthymus-DNA	Isolat HKI
Kaliumacetat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydroxid	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Kalziumcarbonat	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Kupfer(III)chlorid	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
L-Methionin	Fluka (Steinheim)

L-Methionin-methyl- ¹³ C	Isotec (Miamisburg, OH, USA)
Maismehl (Cornsteep)	Reformhaus (Tonndorf)
Malonsäure	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Mangan(II)chlorid	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Natriumpropionat	Roth (Karlsruhe)
Natriumsulfat	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Natriumtetraborat	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
N-Methyl-N-nitroso-harnstoff	Herstellung Organikum (1993), 19, 561
Pyridin	VWR International GmbH (Darmstadt)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Schwefelsäure	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
SeaKem LE Agarose	Cambrex Bio Science (Rockland, ME, USA)
Silbernitrat	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Roth (Karlsruhe)
TAE	Roth (Karlsruhe)
Trifluoressigsäure	Biosolve B.V. (Valkenswaard, Niederlande)
TRIS	Roth (Karlsruhe)
Zinkchlorid	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)

5.2 Liste spezieller Agenzien molekularbiologischer Arbeiten

1kb-DNA-Marker	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
BAL-31-Nuklease	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
BAL-31-Puffer	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
BSA	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
dNTP	Promega GmbH (Mannheim)
GFX PCR DNA und Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England)
HMW-Marker	Gibco BRL (Karlsruhe)

IPTG	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Klenow-Enzym	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Klenow-Puffer	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Loading Buffer	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
pBluescript II SK (+)	Stratagene (Heidelberg)
pOJ260 (Suizidvektor)	HKI, nach Bierman et al., 1992
NEB-Restriktionspuffer 1	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
NEB-Restriktionspuffer 2	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
NEB-Restriktionspuffer 3	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
NEB-Restriktionspuffer 4	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Restriktionspuffer <i>Bam</i> H I	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Restriktionsenzym- <i>Asc</i> I	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Restriktionsenzym- <i>Bam</i> H I	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Restriktionsenzym- <i>Eco</i> R I	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Restriktionsenzym- <i>Eco</i> R V	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Restriktionsenzym- <i>Hind</i> III	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Restriktionsenzym- <i>Not</i> I	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Restriktionsenzym- <i>Sac</i> I	New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
RNase A	Roth (Karlsruhe)
SAP	Large Scale Biology Corporation (Vacaville, CA, USA)
T4-DNA-Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase-Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)

5.3 Lösungen spezieller Zusammensetzung

GET-Puffer	1M TRIS-HCl (pH 8,0) 2,5 ml, 0,5 M EDTA 2,0 ml, Glucose (wasserfrei) 0,9 g, VE-Wasser ad 100 ml, Autoklav: 121 °C, 20 min
KOAc / HOAc-Lösung	KOAc 73,5 g, HOAc 28,75 ml, VE-Wasser ad 250 ml (pH 4,8), 4 °C
NaOH / SDS-Lösung	10% SDS-Lösung 1ml, 2 M NaOH 1 ml, VE-Wasser ad 10ml
NaH ₂ PO ₄ -Pufferlösung	0,15 M NaH ₂ PO ₄ (pH 6,0)

PBS	NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g, Na ₂ HPO ₄ 1,44 g, KH ₂ PO ₄ 0,24 g, VE-Wasser ad 1000 ml, (pH 7,4), Autoklav: 121 °C, 20 min
Spurensalze R2	ZnCl ₂ 40 mg/l, FeCl ₃ x 6 H ₂ O 200 mg/l, CuCl ₂ x 6 H ₂ O 10 mg/l, MnCl ₂ x 4 H ₂ O 10 mg/l, Na ₂ B ₄ O ₇ 10 mg/l, (NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ x 6 H ₂ O 10 mg/l, VE-Wasser ad 1000 ml, Autoklav: 121 °C, 20 min

5.4 Lösungsmittel

Die Lösungsmittel der chemischen und analytischen Methoden entsprachen zumeist p.A.- und Spektroskopiequalität und wurden von Merck (Darmstadt), der Firma Roth (Karlsruhe) und Fluka (Steinheim) bezogen. Die für die NMR verwendeten deuterierten Lösungsmittel (DMSO-*d*₆, CDCl₃ und Pyridin-*d*₅) stammten von der Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, USA). Für die HPLC wurden HPLC-reine Lösungsmittel von Merck (Darmstadt) und Biosolve LTD (Valkenswaard, Niederlande) verwendet. Die Gewinnung des Wassers zum Einsatz in der HPLC erfolgte durch spezielle Entionisierung (Kap. 5.5) von VE-Wasser. Die Lösungsmittel der biologischen Testungen und molekularbiologischen Arbeiten entsprachen höchster Reinheit für biochemische Zwecke.

5.5 Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius BP 3100S (Sartorius GmbH, Göttingen)
Elektroporator	E. coli Pulser (Bio-Rad, Hercules, Kanada)
Mikrozentrifuge	Capsule HF-120 (Tomy Seiko & Co., Tokio, Japan)
Rotationsverdampfer	Pumpensystem Rotavac control, Rotacool, Laborota 4000 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
Wasseraufbereitungssystem- HPLC-Wasser	Elgastat UHQPS (Elga AB, Partille, Schweden)
Schüttelmaschine 1	Sonderanfertigung (Amplitude 10 cm) (Infors AG, Bottmingen)
Schüttelmaschine 2	Sonderanfertigung (Amplitude 5 cm) (Infors AG, Bottmingen)
Sterile Werkbank	K-Safety (Kojair Tech Oy, Vilpulla, Finnland)
Ultraschallbad	Sonorex-RK 52H (Bandelin Electronic, Berlin)
Heizplatte	Thermoplate S (Desaga GmbH, Wiesloch)
Vortexer	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA)
Zentrifuge 1	Centrifuge 5415R (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)

Zentrifuge 2	Centrifuge 5810R (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
Zentrifuge 3	J6-HC Centrifuge (Beckmann, Fullerton, CA, USA)
Thermostat	ThermoStat plus (0,5ml) (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
Block Heater	Block Heater Stuart Scientific (Stuart Scientific, Redhill Surrey, UK)
Thermomixer	Thermomixer comfort (1,5ml) (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
Evaporator	Concentrator 5301 (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
Elektrophorese-Kammer	Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Denver, CO, USA)
Gel-Dokumentation	GeneGenius (VWR International GmbH, Darmstadt)

5.6 Chromatographische und spektroskopische Geräte

<u>HPLC-Anlagen 1</u>	Shimadzu, Kyoto, Japan Autosampler: SIL-10A2, Pumpen: LC-10AD, Degasser: Degasys DG-1200, Detektor: SPD-M10AVP (DAD), System-Controller: SCL-10AVP, Säulenofen: CTO-10A, Software: Class VP 5,0
<u>HPLC-Anlage 2</u>	Shimadzu, Kyoto, Japan 2 Pumpen: LC-10ATVP, Degasser: GT-104, Detektor: SPD-M10AVP, System-Controller: CBM-10AVP, Säulenofen: CTO-10A, Fraktionssammler: FC 203 (Gilson), Software: Class LC 10
<u>HPLC-Anlage 3</u>	Shimadzu, Kyoto, Japan 2 Pumpen: LC-8A, Detektor: SPD-10A, System-Controller: SCL-8A, Fraktionssammler: FCV-100B, Datenbearbeitung: C-R4AX Chromatopac, Basic Serie 3
IR-Spektrometer	Satellite FTIR (Mattson, Madison, WI, USA)
<u>Massenspektrometer 1</u>	<i>ESIMS / Tandem-MS (MS/MS)</i> : VG Quattro mit ESI-Quelle (VG Biotech Altrincham, England), Eluent MeOH/H ₂ O = 99:1, Flussrate: 15µl/min, Temperatur: 65 °C
<u>Massenspektrometer 2</u>	<i>ESIMS / Tandem-MS (MS/MS) / MSⁿ</i> : Benchtop Massenspektrometer Finnigan LCQ (Finnigan, Bremen)
<u>Massenspektrometer 3</u>	<i>HREIMS / HRESIMS</i> : Hochauflösendes doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer Finnigan MAT 95XL mit

	austauschbarer Ionenquelle (Finnigan, Bremen)
NMR-Spektrometer	DRX 300 oder DRX 500 (Bruker, Fällanden, Schweiz)
UV-Lampe für DC	HP UVIS (Desaga GmbH, Wiesloch)
UV-Vis-Photometer	Zweistrahls-Photometer Specord 200 (Analytik Jena AG, Jena)

5.7 Verbrauchsmaterialien für mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

Es wurden sterile Einmalware der Firmen Greiner Labortechnik (Frickenhäusen), Eppendorf (Hamburg) und Brand (Wertheim) verwendet.

5.8 Kulturmedien

5.8.1 Kulturmedien – Fermenter

Hafermehl 20 g/l, Agar 20 g/l, VE-Wasser ad 1000 ml,
(pH 6,8 - 7,0), Autoklav: 121 °C, 20 min

Das Medium wurde in Schrägagarröhrchen verwendet.

1. *Vorkultur* (VAM 10) Glucose (technisch) 15 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/l, KH_2PO_4 1 g/l [0,4 ml Stammlösung (120 mg/ml) vor Beimpfung pro 50 ml zugeben], NaCl 5 g/l, CaCO_3 1 g/l, Spurensalze (R2) 1 ml, VE-Wasser ad 1000 ml, (pH 6,8), Autoklav: 121 °C, 35 min

2. *Vorkultur* (VAM 9) Glucose (wasserfrei) 20 g/l, Hefeextrakt 0,5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/l, KH_2PO_4 1 g/l [3,2 ml Stammlösung (120 mg/ml) vor Beimpfung pro 400 ml zugeben], NaCl 5 g/l, CaCO_3 1 g/l, Spurensalze (R2) 1 ml, VE-Wasser ad 1000 ml, (pH 6,8), Autoklav: 121 °C, 35 min

Hauptkultur (HAM 5) Glucose (technisch) 25 g/l, Cornsteep 7,5 g/l, KH_2PO_4 0,25 g/l, NaCl 5 g/l, VE-Wasser ad 1000 ml,

(pH 6,8), Autoklav: 121 °C, 30 min

Im Fermenter wurde Entschäumer [Desmophen (Rheinchemie Rheinau GmbH), 25 ml auf 180 l] zugesetzt.

5.8.2 Kulturmedien - Schüttelkulturen für Fütterungsversuche

Für die Schüttelkulturen wurden VAM 9 als Vorkulturmedium und HAM 5 als Hauptkulturmedium verwendet. (s. Kap. 5.8.1)

5.8.3 Kulturmedien - Molekularbiologie

LB-Medium in 500 ml: Bacto™ Tryptone 5 g, Bacto™ Yeast Extract 2,5 g, NaCl 2,5 g,
(flüssig) VE-Wasser ad 500 ml,
Autoklav: 121 °C, 30 min

In Kap. 5.14 wurde LB-Flüssigmedium mit 40 µl/ml Apramycin verwendet.

LB-Medium in 500 ml: Bacto™ Tryptone 5 g, Bacto™ Yeast Extract 2,5 g, NaCl 2,5 g,
(fest) Agar 7,5 g, VE-Wasser ad 500 ml,
Autoklav: 121 °C, 30 min

Das Medium wurde verflüssigt (Mikrowelle), in Kulturschalen ausgegossen und einige Minuten unter der Laminar-Flow-Box getrocknet.

In Kap. 5.15.4 wurde das LB-Festmedium mit 40 µl/ml Apramycin oder 40 µl/ml Ampicillin verwendet.

5.9 Kultivierung des Stammes HKI0179 8/2000 im Fermenter

Anzucht des Impfmateriails

Der Produktionsstamm *Streptomyces tendae* HKI0179 8/2000 wurde in Schrägagarröhrchen auf Hafermehlagar (Kap. 5.8.1) 14 Tage bei 28 °C kultiviert. Von der grau versporteten Oberfläche wurden Sporen durch Abschwemmung mit 10 ml PBS (Kap. 5.3.) gewonnen. Die Anzucht des Impfmateriails erfolgte in 2 Stufen:

Erste Vorkulturstufe:

5 x 60 ml VAM10 (Kap. 5.8.1) in 500 ml-Erlenmeyerkolben wurden mit der Sporensuspension beimpft. Die Sporenkonzentration betrug dabei 1 bis 2×10^7 /ml Medium. Die Kulturen wurden 48 h bei 28 °C und 200 U/min (5 cm Auslenkung) inkubiert.

Zweite Vorkulturstufe:

8 x 400 ml VAM9 (Kap. 5.8.1) in 2l-Erlenmeyerkolben wurden mit jeweils 20 ml aus der ersten Vorkulturstufe beimpft und die Impfkulturen 26 – 28 h bei 28 °C und 160 U/min (10 cm Auslenkung) inkubiert.

Fermentation

Die Fermentation wurde in einem 300 l-Rührkesselfermenter (B. Braun Biotech International, Melsungen) durchgeführt. 180 l Nährmedium HAM5 wurden 30 min bei 121 °C im Fermenter sterilisiert und dann mit ca. 3 l Impfkultur (VAM 9) beimpft (Kap. 5.8.1).

Fermentationsbedingungen:

Temperatur	28 °C
Belüftung	50 l/min
Überdruck	200 mbar
Rührerdrehzahl	250 U/min
pH-Regelung	bei 5,5 mit 5N NaOH

Nach 48 h Kultivierung wurde die Fermentation beendet.

5.10 Isolierung der Cervimycine aus einem 180-Liter-Fermentationsansatz

(Siehe hierzu Kap. 3.4.2)

1. Die Aufarbeitung der Kulturlösung (ca. 180 l) fand im Großmaßstab statt. Das Myzel und das Kulturfiltrat wurden getrennt und für die weitere Aufarbeitung nur das Kulturfiltrat verwendet. Nach pH-Einstellung auf 5,0 wurde dieses 1:1 (v/v) mit EtOAc extrahiert und der anschließend auf ca. 10 l eingeeengte Extrakt nochmals mit Wasser (pH 5,0) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum vollständig eingeeengt.
2. Das Rohextrakt (ca. 30 g) wurde in wenig CHCl_3 aufgenommen und die lipophilen Stoffe (z.B. Entschäumer) mit einem Überschuss an Petrolether herausgelöst und das Fällungsprodukt nach Filtration weiterverarbeitet.
3. Das Fällungsprodukt wurde über eine I. Sephadex-LH20-Säule (50 x 5,5 cm i.d.) gelchromatographisch (s. Kap. 5.16.4) grob vorgereinigt.*
4. Die relevante Fraktion aus der I. Säule wurde über die II. Sephadexsäule (130 x 6 cm i.d.) in mehrere wirksame Fraktionen getrennt.*
5. Die Trennung der Reinsubstanzen erfolgte anschließend mittels präparativer HPLC (s. Kap. 5.16.3).

*Die Identifizierung aktiver Fraktionen wurde mit Hilfe des Agardiffusionstestes (EAB 3, 1997) und analytischer HPLC (s. Kap. 5.16.3) gewährleistet.

5.11 Interkalationsversuch

Von den Substanzen (Cervimycine A, C, D, K und der Referenz Daunomycin) wurden Stammlösungen zu 1 mg/ml in MeOH angefertigt und daraus 50 μM bzw. 10 μM Messlösungen in 0,15 M NaH_2PO_4 -Puffer (pH 6,0) hergestellt und diese in einem UV-Vis-Zweistrahlphotometer (Kap. 5.17.1) vermessen. Danach wurden sukzessiv 9 x 50 μl einer Kalbsthymus-DNA-Lösung ($1337,4 \cdot 10^{-6}$ M in 0,15 M NaH_2PO_4 -Puffer) zur Mess- und Vergleichslösung (0,15 M NaH_2PO_4 -Puffer) hinzugegeben, jeweils mit einem PVC-Stäbchen langsam verrührt und nach jeder Zugabe das Spektrum aufgenommen. Zur Kontrolle des Verdünnungseffektes wurde einer 50 μM Cervimycin C-Lösung in gleicher Aliquotierung 0,15 M NaH_2PO_4 -Puffer anstelle DNA-Lösung zutitriert und identisch vermessen. Die Konzentration der Kalbsthymus-DNA wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie über die Extinktion bei 260 nm ($\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt.

5.12 Metaboliteneinbautest

Dieser Versuch wurde von der Fa. Bayer entsprechend dem nachfolgendem Protokoll durchgeführt:

Bacillus subtilis-Kultur:

Bacillus subtilis 168 wurde in einer Übernachtskultur in Belizki-Medium (Fa. Bayer-intern) angezogen, davon 200 μl in 25 ml Belizki-Medium verdünnt und bei 160 U/min, 37 °C bis zu einer Extinktion ($\lambda = 535 \text{ nm}$) von OD 0,1 bis 0,15 vermehrt. Danach wurde nochmals auf OD 0,02 mit vorgewärmten Medium verdünnt und für eine weitere 1/2 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von unmarkiertem Leucin (1 μM) und Phenolrot von 200 μl auf 100 ml.

Für 4 markierte Metaboliten (^3H -markiertes: Leucin, Thymidin, Uridin, Glucosamin) wurden je 25,5 ml *Bacillus subtilis*-Medium (berechnet mit Überschuss) benötigt.

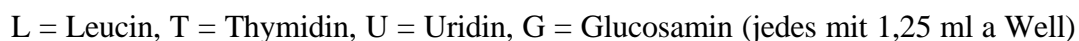
Metabolitenzugabe:

Die Radioaktivität aller Metabolitenstammlösungen betrug 37 MBq/ml. Gefordert waren 0,02 MBq/ml, so dass 25,5 ml *Bacillus subtilis*-Suspension mit 13,78 μl Metabolitenstammlösung versetzt wurden (= Metaboliten-Keimlösung).

Substanzlösungen:

Es wurden Cervimycin A- und C-Messlösungen zu 1,56 $\mu\text{g/ml}$, 6,25 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ (1/4 x MHK, 1 x MHK, 4 x MHK, 8 x MHK) verwendet.

Von jeder Metaboliten-Keimlösung wurden 8 x 1,25ml in die vorgegebenen Wells der Deep-Wellplatte eingefüllt (Doppelbestimmung je Substanzkonzentration) und nach der Eingabe sofort 100 µl jeder Lösung in die mit 12 %iger Perchlorsäure (PCA) vorbereitete Multi-Screen-Filterplatte in Zeitpunkt 0 gegeben. Die Deep-Wellplatte wurde anschließend bei 45 °C und 750 U/min im Thermomixer behandelt. Nach 5 min erfolgte die Zugabe der Präparatelösungen (je 100 µl, vorgelegt in einer Rundbogen-Mikrotiterplatte) in die Deep-Wellplatte und nach gutem Mischen die Entnahme des 5 min-Wertes. Weitere Probeziehungen fanden identisch nach 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 und 60 min statt.



Die Filterplatte wurde nach 60 min abgesaugt und mit 100 µl Ethanol je Well nachgespült, bei Raumtemperatur 2-3 h getrocknet und danach jedes Well mit 30 µl Scintflüssigkeit Ultima Gold versetzt. Nach 30 min Einwirkzeit wurde im β -Counter vermessen.

5.13 Durchführung der Fütterungsversuche

5.13.1 Vorbereitung der ^{13}C -markierten bzw. deuterierten Substanzlösungen

Die markierten Substanzen wurden entsprechend **Tab. 11** eingewogen und mit VE-Wasser auf $\frac{3}{4}$ des berechneten Zufütterungsvolumens (Kap. 5.13.2) verdünnt. Dann wurde der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls auf pH 7,0 eingestellt. Die Lösungen wurden auf das vollständige Endvolumen mit VE-Wasser aufgefüllt und mit Hilfe eines StericupTM-

Filtersystems [0,22 µm, Roth (Karlsruhe)] keimfrei filtriert und zur Fütterung verwendet. Das Zufütterungsvolumen wurde dabei immer mit 10 %igem Überschuss berechnet.

In **Tab. 11** sind die molaren Konzentrationen der markierten Substanzen und die Gesamtvolumina der Hauptkulturen zusammengefasst.

Tab.11 Zusammenfassung der eingesetzten Konzentration der markierten Präkursoren.

Markierte Substanz	Konzentration [mmol/l 1 Hauptkultur]	Gesamtvolumen der Hauptkultur [l]
1,2,3- ¹³ C ₃ -Malonsäure	1,8	4
1,3- ¹³ C ₂ -Malonsäure	1,8	3,5
2- ¹³ C-Malonsäure	1,8	4
L-Methionin-methyl- ¹³ C	1,6	5
¹³ C ₆ -D-Glucose	3,6	1
<i>d</i> ₈ -L-Valin	0,2	1

(Malonsäure: M = 104 g/mol, L-Methionin: M = 149 g/mol, L-Valin: M = 117 g/mol)

5.13.2 Fütterung der markierten Biosynthesevorläufer

Die Fütterungsversuche wurden in Schüttelkulturen durchgeführt. Der Stamm HKI0179 8/2000 (Sporensuspension) wurde in einer Vorkultur VAM 9 über 32 h bei 160 U/min (10 cm Auslenkung) und 28 °C angezüchtet und das Hauptkulturmedium HAM 5* in 1 Liter-Erlenmeyerkolben (500 ml Medium) mit 5 % der Vorkultur beimpft und ebenfalls bei 28 °C und 160 U/min geschüttelt (s. auch Kap. 5.8.2). Die Zugabe der Präkursorenlösungen (Kap. 5.13.1) erfolgte in je 5 ml-Portionen zu jeder 500 ml- Kultur nach 14, 17, 19 und 21 h nach Inkubation (sog. Pulse-Feeding-Methode, Paululat et al., 1999). Das Zufütterungsvolumen der Präkursorenlösung betrug somit insgesamt 20 ml pro 500 ml Kultur.

*Für die Markierung mit uniform gelabelter D-Glucose wurde im HAM 5-Medium an Stelle der 25 g/l nur 20 g/l Glucose eingesetzt.

5.13.3 Aufarbeitung der Schüttelansätze

Die Schüttelkulturen wurden nach 48 h (Zeitpunkt maximaler Cervimycin C-Ausbeute) abgebaut und in einer Beckmann-Zentrifuge bei 4000 U/min in 25 min in Myzel und Kulturfiltrat getrennt. Das Myzel wurde mit ausreichend MeOH und das Kulturfiltrat mit 1:1 (v/v) EtOAc über Nacht extrahiert. Das bis auf ¼ eingeeengte MeOH-Extrakt des Myzels wurde nach Aufnahme mit einem Überschuss an Wasser (pH 5,0) mehrmals mit EtOAc reextrahiert, die organischen Phasen von Myzel und Kulturfiltrat vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum vollständig eingeeengt. Das Rohextrakt wurde an Sephadex LH20 (50 x 5,5 cm i.d.) (Kap. 5.16.4) vorgereinigt und 2 Fraktionen mit einem Gemisch aus den

Cervimycinen erhalten. Die weitere Aufreinigung in die Cervimycine A, B, C und D erfolgte mittels präparativer HPLC (Kap. 5.16.3).

Nachfolgend sind die für die Auswertung der Markierungsversuche relevanten Cervimycine und ihre Ausbeuten aufgeführt:

Cervimycin A: 10,3 mg (2-¹³C-Malonsäure)

Cervimycin C: 66,4 mg (2-¹³C-Malonsäure), 51,0 mg (1,2,3-¹³C₃-Malonsäure) und 36,4 mg (L-Methionin-methyl-¹³C), 27,3 mg (¹³C₆-D-Glucose), 11,2 mg (*d*₈-L-Valin)

Cervimycin D: 4,5 mg (1,3-¹³C₂-Malonsäure)

Das *d*₈-L-Valin-gelabelte Cervimycin C wurde mittels ESIMS und ESIMSⁿ ausgewertet, während für die markierten Cervimycine der ¹³C-Markierungen ¹H und ¹³C NMR-Spektren in Pyridin-*d*₅ (Kap. 5.17.3) aufgenommen wurden. Die ¹³C-Inkorporation wurde, wie nachfolgend in Kapitel 5.13.4 beschrieben, berechnet.

5.13.4 Auswertung der NMR-Daten der markierten Cervimycine

1. Methode: Diese Methode fand Anwendung zur Auswertung des markierten Cervimycin A (2-¹³C-Malonsäure), Cervimycin C (1,2,3-¹³C₃-Malonsäure, L-Methionin-methyl-¹³C) und Cervimycin D (1,3-¹³C₂-Malonsäure).

Bezug auf unmarkierten Kohlenstoff

Alle Kohlenstoffsignale im Aglykon und der Dicarbonsäure im Spektrum des unmarkierten Cervimycins wurden integriert (Bruker WIN-NMR-Software) und die so erhaltenen Flächen relativ auf die Fläche eines nicht markierten Kohlenstoffs (Referenzkohlenstoff) durch die Berechnung des Response-Faktors (RF) bezogen:

$$\frac{A_{\text{umR}}}{A_{\text{umges}}} = \text{RF}$$

A_{umR} = Fläche des Referenzkohlenstoffs im unmarkierten Spektrum

A_{umges} = Fläche des gesuchten Kohlenstoffs im unmarkierten Spektrum

RF = Response-Faktor

Der relative prozentuale Anteil an ¹³C jedes Signals im markierten Spektrum konnte dann nach folgendem Dreisatz berechnet werden:

$$\frac{A_{\text{mR}}}{1,1\%} = \frac{A_{\text{mges}} \cdot \text{RF}}{X}$$

AmR = Fläche des Referenzkohlenstoffs im markierten Spektrum

1,1 % = relative natürliche Häufigkeit des ^{13}C

X = Prozentanteil des ^{13}C im gesuchten Kohlenstoff

2. Methode: Diese Methode fand Anwendung zur Auswertung des markierten Cervimycin C (2- ^{13}C -Malonsäure).

Satellitenmethode

^{13}C -Kerne einer C-H-Gruppierung verursachen „Satelliten“ beiderseits der Hauptresonanz des gebundenen Protons im ^1H Spektrum. Auf Grund der geringen natürlichen Häufigkeit des ^{13}C sind sie in Spektren unmarkierter Substanzen nicht zu erkennen, dafür jedoch in ^{13}C -markierten Substanzen auszumachen und können an Hand ihrer Flächenverhältnisse zur Fläche des Hauptpeaks zur Berechnung des Prozentanteils des ^{13}C herangezogen werden. Voraussetzung hierfür ist ein freistehendes Proton einer solchen markierten C-H-Gruppe im ^1H Spektrum der markierten Substanz.

$$\frac{A1 + A3}{A1 + A2 + A3} = \%^{13}\text{CmR}$$

$\%^{13}\text{CmR}$ = Prozentanteil des ^{13}C im C-H-Resonanzkohlenstoff im markierten Spektrum

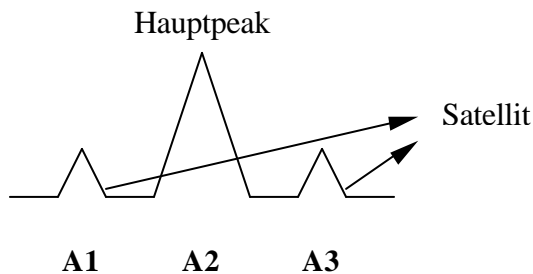


Abb. 59 Resonanzen eines Protons einer ^{13}C -markierten C-H-Gruppe mit den sichtbaren Satelliten.

In Analogie zur 1. Methode wurden die Response-Faktoren (im Vergleich zum Referenzkohlenstoff = C der C-H-Gruppe) im unmarkierten Spektrum berechnet und über den Dreisatz die Prozentanteile des ^{13}C aller anderen Kohlenstoffen (X) bestimmt. Dafür wurde an Stelle des formal angenommenen 1,1 %-Wertes der relativen natürlichen ^{13}C -Häufigkeit der vorher über die Satelliten berechnete $\%^{13}\text{CmR}$ -Wert eingesetzt.

5.14 Fermentation der Mutante *Streptomyces tendae* HKI0179::pXU01 zum Funktionsbeweis der Cervimycin-Polyketidsynthase

Von einem Hafermehlschrägagarröhrchen der Mutante *Streptomyces tendae* HKI0179::pXU01 wurde mit 10 ml steriler NaCl-Lösung eine Abschwemmung hergestellt, diese mit weiterer NaCl-Lösung 1:5 verdünnt und zu je 2,5 ml auf die Vorkulturkolben (100 ml) mit VAM 9 [versetzt mit 100 µl Apramycinlösung (40 µg/ml)] eingegeben. Diese wurden 30 h bei 160 U/min und 28 °C fermentiert. Anschließend erfolgte die Beimpfung von zwei Kolben (100 ml) Hauptkulturmedium HAM 5 [versetzt mit 100 µl Apramycinlösung (40 µg/ml)] mit 5 % der Vorkultur, die dann 48 h bei 160 U/min und 28 °C geschüttelt wurden. Parallel wurden zwei Vergleichskolben mit dem Stamm *Streptomyces tendae* HKI0179 8/2000 mitgeführt (Kap. 5.8.1).

Jeder Kolben wurde mit 100 ml Aceton:EtOAc (1:1) über Nacht extrahiert, die organische Phase zweimal mit Wasser (pH 5,0) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und vollständig im Vakuum eingengt. Der Rückstand jedes Kolbens wurde mit 10 ml MeOH (Verdünnungsfaktor = 1000) aufgenommen und in der analytischen HPLC (Kap 5.16.3) vermessen.

5.15 Molekularbiologische Arbeiten

5.15.1 Isolierung der Mutanten-DNA

Die DNA-Isolierung erfolgte nach Standardmethoden entsprechend Sambrook und Russell, 2001.

5.15.2 Asc I-Restriktionsansatz zum Verdau der Mutanten-DNA

5 µl Mutanten-DNA

20 µl H₂O

3 µl NEB-Restriktionspuffer 3

2 µl Asc I

Die Umsetzung erfolgte in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß. Das Mischen der Einzelkomponenten wurde dabei unter Eiskühlung durchgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Danach wurde der Ansatz bei 65 °C 10 min inaktiviert.

5.15.3 Religierung der verdauten Mutanten-DNA

12,5 µl verdaute Mutanten-DNA

1,5 µl 10 x T4-DNA-Ligase

1 µl T4-DNA-Ligase

Die Umsetzung erfolgte in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß. Das Mischen der Einzelkomponenten wurde unter Eiskühlung durchgeführt. Der Ansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert. Eine Inaktivierung war nicht notwendig.

5.15.4 Transformation der Plasmide in *E. coli* XL1blue mittels Elektroporation

Die Plasmide der religierten Mutanten-DNA (Kap. 5.15.3) und die pBluescript-Plasmide (Kap. 5.15.7) wurden in gleicher Weise transformiert.

1,5 µl Plasmidlösung wurde in 50 µl *E. coli* XL1blue-Suspension (kurz vorher aufgetaut) einpipettiert, die Plasmid-*E. coli*-Mischung blasenfrei in eine UV-sterilisierte und eisgekühlte Küvette überführt, und diese im Elektroporator mit einem Stromstoß von 2,5 V behandelt. Anschließend wurde das Transformationsgemisch mit 1 ml LB-Medium (Kap. 5.8.3) in ein 1,5 ml-Eppendorftube gegeben und bei 37 °C 10 min geschüttelt, zentrifugiert und die obere Flüssigkeit abgegossen. Die Zellen der transformierten Plasmide des Kapitels 5.15.3 wurden auf Apramycin-haltige (40µg/ml) LB-Platten verteilt, während die des Kap. 5.15.7 auf Ampicillin-haltiges (40µg/ml) LB-Medium (zusätzlich versetzt mit 40µl X-GAL und 10µl IPTG) ausgestrichen wurden (s. auch Kap. 5.8.3). Die Inkubation aller Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

- Apramycin-resistente Klone wurden gepickt und die Plasmid-DNA über Mini- bzw. Maxipräparation aus *E. coli* gewonnen (Kap. 5.15.5). Von 12 apramycinresistenten Klonen der religierten Mutanten-DNA wurde Kolonie 3 mit der größten Insert-DNA identifiziert (Gesamtgröße = 12kb) und für die Shotgun-Bibliothek (Kap. 5.15.6) weiterverwendet.*

*Um die Größe der Plasmid-DNA, welche aus dem *Asc* I-Verdau hervorging, besser einschätzen zu können, wurden zusätzliche Verdaus mit *Eco*R I+*Hind* III, *Bam*H I, *Sac* I und *Not* I durchgeführt, und die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese nachgewiesen.

- 192 positive weiße Klone (aus Blau/Weiß-Selektion) der pBluescript-Plasmide konnten gefunden werden, von denen 96 sequenziert wurden (Kap. 5.15.8).

5.15.5 Mini- und Maxipräparation – Gewinnung der Plasmid-DNA aus *E. coli*

Beide Präparationsmethoden zum Erhalt von Plasmid-DNA erfolgten nach Standardmethoden entsprechend Sambrook und Russell, 2001.

5.15.6 Shotgun-Bibliothek mit der 12 kb-Plasmid-DNA (Kolonie 3)

Ultraschallbehandlung

50 µl Plasmid-DNA der Kolonie 3 wurden mit 300 µl H₂O in einem 15 ml Falcon-Tube gefüllt und 6 s mit Ultraschall behandelt. Dabei entstanden 4-6 kb große DNA-Stücke.

BAL-31-Verdau

300 µl Ultraschall-DNA (Kolonie 3)

300 µl BAL-31-Puffer (2 x)

2 µl BAL-31

Die 4-6 kb großen DNA-Fragmente wurden mit BAL-31-Nuklease zu 1-2 kb-großen Einheiten verdaut. Die Umsetzung erfolgte in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß. Das Mischen der Einzelkomponenten wurde unter Eiskühlung durchgeführt. Der Ansatz wurde bei 37 °C über 20 min inkubiert und bei 70 °C 10 min inaktiviert.

Fällung und Aufreinigung der verdauten DNA

Der inaktivierte BAL-Ansatz wurde mit 600 µl Isopropanol und 60 µl NaOAc-Lsg. (pH 5,2) geschwenkt, bei 13000 U/min 5 min zentrifugiert, und das Pellet mit 500 µl EtOH gewaschen, ebenfalls zentrifugiert, die ethanolische Lösung abgenommen, und die DNA im Concentrator 5301 getrocknet.

„Klenow-Repair“-Reaktion

trockene DNA gelöst in 27 µl H₂O

3 µl Klenow-Puffer (10 x)

1 µl 10 mM dTNP

2 µl Klenow-Enzym

Diese Reaktion diente dem Auffüllen der durch die Ultraschallbehandlung verursachten versetzten DNA-Enden („sticky ends“) mit Nukleotiden, um die zu ligierende DNA für die stumpfen Enden („blunt ends“) des Vektors, welcher mit *EcoR* V geschnitten wurde (Kap. 5.15.7), passfähig zu machen. Die Umsetzung erfolgte in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß. Das Mischen der Einzelkomponenten wurde unter Eiskühlung durchgeführt. Der Ansatz wurde bei RT 30 min inkubiert und dann bei 65 °C 20 min inaktiviert. Die aufgefüllten DNA-Fragmente wurden über Gelelektrophorese (Kap. 5.15.9) aufgetrennt, mittels GFX-Aufreinigungs-Kit vom Gel separiert und der Ligation (Kap. 5.15.7) zugänglich gemacht.

5.15.7 Ligation der 1-2 kb-DNA in pBluescript-Vektor II SK (+)

Vorbereitung des pBluescript-Vektors II SK (+) durch EcoR V-Verdau

5 µl pBluescript II SK (+)

2 µl NEB-Restriktionspuffer 3

0,2 µl BSA

11,8 µl H₂O

2 µl *EcoR* V

Die Umsetzung erfolgte in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß. Das Mischen der Einzelkomponenten wurde unter Eiskühlung durchgeführt. Es wurde bei 37 °C über 3 h inkubiert, dann 2 µl SAP zugegeben und anschließend bei 70 °C 10 min inaktiviert. *EcoR* V verursachte stumpfe Enden („blunt ends“) an der *EcoR* V-Schnittstelle des pBluescript-Vektors (auch Kap. 5.15.6).

Ligation

2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (5 x)

1 µl T4-DNA-Ligase

1 µl geschnittener pBluescript-Vektor II SK (+)

14 µl 1-2 kb-DNA

2 µl H₂O

Vektor und 1-2 kb-DNA wurden 10min bei 55 °C erhitzt. Dann wurde unter Eiskühlung Puffer und Ligase zugegeben und bei 16°C über Nacht inkubiert. Die entstandenen Plasmide wurden danach in *E. coli* XL1blue transformiert (Kap. 5.15.4).

5.15.8 Sequenzierung der positiven Klone der pBluescript-Plasmide

Zwei 96er Wellplates wurden mit 120 µl LB/Ampicillin-Medium pro Well bestückt, und die gepickten Einzelkolonien in die einzelnen Wells überimpft. Die abgedichteten Platten wurden dann über Nacht bei 37 °C und 300 U/min geschüttelt, anschließend in jedes Well 40 %iges Glycerin eingefüllt (Endkonzentration = 20%) und bei –80 °C aufbewahrt.

Die Sequenzierung von 96 Klonen fand in einer speziellen Deep-Wellplatte bei der Fa. Integrated Genomics (Jena) statt (Nukleotid- und Proteinsequenzen s. Anhang).

5.15.9 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Elektrophoresekammer mit einer Spannung zwischen 25 bis 100 V. Zumeist wurden Agarosegele verwendet (1 % mit 1 % TAE), die für

analytische Zwecke zur Detektion 0,001 % Ethidiumbromid enthielten. Als Vergleiche dienten je nach Bedarf 1 kb- bzw. High Molecular Weight Marker (HMW-Marker).

5.16 Chromatographische Methoden

5.16.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Stationäre Phase:	Normalphase: Kieselgel 60 F ₂₅₄ Umkehrphase: RP-18 F _{254s} Jeweils 20 x 20-Aluminiumplatten (Merck, Darmstadt) DC-präparativ: Kieselgel 60 F ₂₅₄ Kieselgel-Glas-Platten 20 x 20, 1 mm (Merck, Darmstadt)
Laufmittel:	1 CHCl ₃ -MeOH (9:1) 2 CHCl ₃ -MeOH (15:1) 3 CH ₂ Cl ₂ -MeOH-Eisessig (95:5:0,1) 4 MeCN (83%)-Trifluoressigsäure (0,1%)
Detektion:	Visualisierung im Tageslicht, UV-Lampe (Kap. 5.6) und speziell zur Analytik der Hexosen mit folgenden Reagenzien: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz und Silbernitrat-Natronlauge-Reagenz (Jork et al., 1989)

5.16.2 Säulenchromatographie (SC)

Die Säulenchromatographie wurde an Normalphasen-Kieselgel 60 (70-230 mesh ASTM, Merck, Darmstadt) in einer Glassäule (300 x 20 mm i.d.) durchgeführt. Das Kieselgel wurde am Vortag in Laufmittel aufgeschlämmt und in die Glassäule gefüllt. Die Trennung erfolgte mit folgendem Laufmittelgradienten:

Laufmittelgradient:	1. CHCl ₃ -MeOH (15:1) 2. CHCl ₃ -MeOH (10:1)
---------------------	--

5.16.3 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Analytische HPLC

Die analytische HPLC wurde an der HPLC-Anlage 1 (Kap. 5.6) durchgeführt. Der Nachweis der Substanzen erfolgte an Hand der Retentionszeiten und des Vergleichs der UV-Vis-Spektren.

Säule: Nucleosil 100 C18, 5 µm; 125 x 3 mm
(GROM, Herrenberg-Kay)

Laufmittelgradient I: 1 min 99,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 0,5% MeCN
bis 16 min auf 0,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 99,5% MeCN
bis 17 min 0,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 99,5% MeCN
bis 22 min auf 99,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 0,5% MeCN

Laufmittelgradient II: 10 min 99,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 0,5% MeCN
bis 70 min auf 0,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 99,5% MeCN
bis 80 min 0,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 99,5% MeCN
bis 90 min auf 99,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 0,5% MeCN

Flussrate: 1 ml/min

Detektion: 247 nm, 436 nm

Semipräparative HPLC

Die semipräparative HPLC wurde an der HPLC-Anlage 2 (Kap 5.6) durchgeführt.

Säule: Nucleosil 100 C18, 5 µm; 125 x 4,6 mm
(GROM, Herrenberg-Kay)

Laufmittelgradient I: 10 min 99,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 0,5% MeCN
bis 70 min auf 0,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 99,5% MeCN
bis 80 min 0,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 99,5% MeCN
bis 90 min auf 99,5% 0,1%ige TFA-Lösung, 0,5% MeCN

Laufmittelgradient II: 1 min 99,5 0,01 mol NH₄OAc-Lsg., 0,5% MeCN
bis 20 min auf 0,5% 0,01 mol NH₄OAc-Lsg., 99,5% MeCN
bis 25 min 0,5% 0,01 mol NH₄OAc-Lsg., 99,5% MeCN
bis 27 min auf 99,5% 0,01 mol NH₄OAc-Lsg., 0,5% MeCN
(0,01 mol NH₄OAc -Lsg. mit pH 5,0)

Flussrate: 5 ml/min

Detektion: 247 nm, 436 nm

Präparative HPLC

Die präparative HPLC wurde an der HPLC-Anlage 3 (Kap. 5.6) durchgeführt.

Säule:	Bischoff Chromatographie, Leonberg Prontosil 120-15-C ₁₈ AQ, 15 µm, 250 x 20mm
Laufmittelgradient:	1 min 80% 0,01mol NH ₄ OAc-Lsg., 20% MeCN (83%) bis 20 min auf 0,5% 0,01 mol NH ₄ OAc-Lsg., 99,5% MeCN (83%) bis 25 min 0,5% 0,01 mol NH ₄ OAc-Lsg., 99,5% MeCN (83%) bis 27 min auf 80% 0,01 mol NH ₄ OAc-Lsg., 20% MeCN (83%) (0,01 mol NH ₄ OAc -Lsg. mit pH 5,0)
Flussrate:	25 ml/min
Detektion:	247 nm

Quantitative HPLC-Bestimmung von Cervimycin C

Die quantitative Konzentrationsbestimmung wurde an der HPLC-Anlage 1 (Kap. 5.6) durchgeführt. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte an Hand einer Kalibrationsgeraden. Aus einer Stammlösung von 1 mg/ml Cervimycin C (in MeOH) wurden je 3 Lösungen der Konzentrationen 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml und 1000 µg/ml hergestellt. Die Lösungen wurden unter analytischen HPLC-Bedingungen (Kap. 5.16.3) mit dem Laufmittelgradient I vermessen und die Kalibrationsgerade mit Hilfe der HPLC-Software (Class VP 5,0) berechnet. Die Kalibrierung wurde regelmäßig mit einer Cervimycin C-Probe bekannter Konzentration überprüft.

5.16.4 Gelpermeationschromatographie

Die Trennung nach Molekülgröße erfolgte als Sephadex LH20 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), das mindestens 24 Stunden im Laufmittel gequollen war. Die Trennungen wurden entsprechend der Aufgabemenge in Glassäulen unterschiedlicher Größe durchgeführt.

Laufmittel: MeOH

5.17 Spektroskopische Verfahren

5.17.1 UV-Vis-Spektroskopie (UV-VIS)

Die UV-Vis-Messungen erfolgten in Quarzküvetten gegen das jeweilige Lösungsmittel. (Physikochemische Daten, s. Anhang).

5.17.2 Massenspektrometrie (MS)

ESIMS: Zur Festlegung der Molekülmassen wurden alle Substanzen mittels ESIMS im positiven als auch im negativen Modus im Massenspektrometer 1 oder 2 (Kap. 5.6) vermessen.

Tandem-MS (MS/MS) und ESI MSⁿ: Zur unterstützenden Strukturaufklärung wurden für einige Substanzen MS/MS- und Fragmentspektren (MSⁿ) mit dem LCQ-Massenspektrometer 2 (Kap. 5.6) aufgenommen. Die Spektren des *d*₈-L-Valin-Fütterungsversuches wurden in gleicher Weise vermessen (s. Kap. 5.13).

HRESIMS und HREIMS: Präzisionsmessungen zur Bestimmung der Summenformeln wurden mit dem Massenspektrometer 3 (Kap. 5.6) durchgeführt.

5.17.3 Kern-Resonanz-Spektroskopie (NMR)

Strukturaufklärung (NMR-Tabellen s. Anhang): Die getrockneten Proben wurden mit deuteriertem Lösungsmittel gelöst (gegebenenfalls filtriert) und in einem 5mm-NMR-Röhrchen vermessen. Es wurden für alle Substanzen 1D-Messungen (¹H; ¹³C; DEPT) und 2D-Messungen (DoubleINEPT oder HSQC; HMBC; COSY und NOESY bzw. ROESY) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 300,31 MHz oder 500,13 MHz (¹H) und 75,48 MHz (¹³C). Die chemischen Verschiebungen (δ) wurden auf das jeweils verwendete deuterierte Lösungsmittel bezogen und in ppm angegeben. Die Multiplizitäten wurden folgendermaßen abgekürzt: (s) Singulett, (brs) breites Singulett, (d) Dublett, (wd) weites Dublett, (t) Triplett, (m) Multiplett.

Fütterungsversuche (Kap. 5.13): Die markierten Substanzen wurden in Pyridin-*d*₅ gelöst und ¹H- (300,13 MHz) und ¹³C- (75,48 MHz) Spektren aufgenommen. Im Fall des mit 1,2,3-¹³C₃-Malonat-markierten Cervimycin C wurde ein zusätzliches INADEQUATE Spektrum gemessen.

5.17.4 Infrarotspektroskopie (IR)

Die IR-Messungen wurden mit der ATR-Methode durchgeführt. Dazu wurden die Proben entweder direkt als Festsubstanz (Spatelspitze) oder als dünner Film (hochkonzentrierte Lösung in verdampfbaren Lösungsmitteln) auf den Diamanten aufgegeben und vermessen.

5.18 Optische Drehung

Die Drehwerte wurden in MeOH oder Pyridin in einer 0,5 dm-Küvette mittels Propol-Polarimeter (Dr. Kernchen, Seelze) vermessen.

5.19 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit der Schmelzpunktapparatur Polytherm A (Wagner und Munz, München) bestimmt.

5.20 Chemische Methoden

5.20.1 Hydrolyse von Cervimycin A zur Gewinnung von Cervimycin E

Eine Lösung von 0,02 mmol (**1**) in 10 ml 0,1 N methanolischer HCl wurde 4 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit 1 N NaOH neutralisiert und nach Zugabe eines Überschusses an Wasser (pH 5,0) mit EtOAc (20 ml) ausgeschüttelt und noch zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum vollständig eingeeengt. Die gelchromatographische Trennung der orange-gelben Substanz an Sephadex LH20 (25 x 1,5cm) (Kap. 5.16.4) ergab 7,5 mg Cervimycin E (**5**).

5.20.2 Hydrolyse von Cervimycin A zur Gewinnung von Cervimycin L und M

0,02 mmol (**1**) in einer Mischung von 20 ml MeOH und 25 ml einer wässrigen 0,1%igen TFA-Lösung wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Ansatz mit gesättigter NaHCO₃-Lösung auf pH 5,0 eingestellt und nach Zugabe des vierfachen Volumens an Wasser (pH 5,0) mehrmals mit kleinen Mengen EtOAc erschöpfend ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum vollständig eingeeengt. Der Rückstand wurde unter den Bedingungen der präparativen HPLC (Kap. 5.16.3) in vier Fraktionen getrennt. Neben dem Edukt (Cervimycin A) konnten 3,5 mg Cervimycin L (**12**) und 5,6 mg Cervimycin M (**13**) als neue Substanzen gewonnen werden. Die vierte Substanz wurde aufgrund der geringen Ausbeute nicht identifiziert.

5.20.3 Hydrolyse von Cervimycin C zur Gewinnung von Cervimycin F

Eine Lösung von 0,16 mmol (**3**) in 50 ml 0,1 N methanolischer HCl wurde über Nacht unter Argonatmosphäre gerührt. Das entstandene Präzipitat wurde filtriert und noch zweimal mit MeOH gewaschen. Der Rückstand ergab ohne weitere Aufarbeitung 48,3 mg Cervimycin F (**6**).

5.20.4 Totalhydrolyse von Cervimycin C zur Gewinnung der 2,3,6-Tridesoxyhexosen

0,04 mmol (**3**) wurde mit 10 ml 2 N wässriger HCl versetzt und unter Argonatmosphäre bei 90 °C (Ölbad) unter Rückfluss 21½ h gerührt. Der Verlauf der Hydrolyse wurde durch Probenziehung mit DC-Kontrolle auf Normalphase mit Laufmittel 1 und Detektion mit

Anisaldehyd/H₂SO₄ oder Silbernitratlösung verfolgt (Kap. 5.16.1). Das aus der Reaktion entstandene Präcipitat (**6**) wurde abfiltriert und das Filtrat mit konzentrierter NaOH-Lösung neutralisiert und im Vakuum zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde anschließend mit 100 ml einer Mischung aus CHCl₃/MeOH (9/1) einen Tag lang gerührt. Unlösliche Bestandteile wurden abfiltriert und nochmals mit der CHCl₃/MeOH (9/1)-Mischung nachgewaschen. Das Filtrat (F1) wurde am Rotationsverdampfer vollständig eingengt und für die Hydrazonfällung (Kap. 5.20.5) weiterverwendet.

5.20.5 Hydrazonfällung der 2,3,6-Tridesoxyhexosen (2,5-Dihydroxy-6-methyl-pyrane)

Der aus der Totalhydrolyse von (**3**) hervorgegangene F1-Rückstand (Kap. 5.20.4) wurde in 1 ml EtOH (95 %) aufgenommen. Diese Sustanzlösung wurde in eine Mischung von 0,4 mmol 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 0,2 ml konzentrierter H₂SO₄ und 2 ml EtOH (75 %) eingegeben und bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Der Ansatz wurde mit 100 ml Wasser versetzt und dreimal mit EtOAc ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum vollständig eingengt. Die weitere Aufreinigung des Rückstandes von ca. 90 mg erfolgte über Säulenchromatographie (s. Kap. 5.16.2). Die neun gewonnen Fraktionen wurden mit NP-DC unter Verwendung von Laufmittel 2 und visueller Detektion (Kap. 5.16.1) kontrolliert, und relevante Banden mittels ESIMS bestimmt. Für Bande 5 der Fraktion 7 konnte die gesuchte Molekülmasse M = 312 gefunden werden. Fraktion 7 wurde präparativ über DC mit Laufmittel 2 (Kap. 5.16.1) weiter aufgereinigt. Bande 3 (M = 312) wurde mit 20 ml eines CHCl₃/MeOH (9/1)-Gemisches extrahiert, filtriert und im Vakuum getrocknet (4,9 mg). Mit Hilfe der semipräparativen HPLC mit dem Laufmittelgradienten I (Kap. 5.16.3) wurden zwei Hydrazone der selben Masse gewonnen und die Drehwerte bestimmt (Kap. 5.18).

5.20.6 O-Methylierung von Cervimycin A (1)

Herstellung von Diazomethan:

3,5 ml 40 %ige KOH in 10 ml Diethylether wurden vorgelegt. Unter Eiskühlung (<5 °C) wurden 10 mmol N-Methyl-N-nitroso-harnstoff (Organikum, 1993) langsam sukzessiv unter leichtem Schütteln zugegeben. Der Ansatz wurde nach letzter Zugabe 3 h stehen gelassen.

Umsetzung mit Diazomethan:

0,012 mmol (**1**) wurden in 5 ml MeOH/Wasser (10:1) gelöst und 0,13 mmol Diazomethan langsam unter Schütteln dazugegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mittels NP-DC unter Verwendung von Laufmittel 3 und UV-Detektion

(Kap. 5.16.1) verfolgt und nach 15 min abgebrochen. Nach Verdampfen des restlichen Diazomethans wurde der Reaktionsansatz im Vakuum vollständig eingeeengt und mit wenig Ether aufgenommen. Die Etherlösung wurde zweimal mit Wasser gewaschen und nach Trocknung über Na₂SO₄ im Vakuum vollständig eingeeengt. Über semipräparative HPLC mit dem Laufmittelgradienten II (Kap. 5.16.3) konnten 9,3 mg des Cervimycin A-methylesters (**14**) gewonnen werden.

5.20.7 O-Methylierung von Cervimycin C (3)

0,016 mmol (**3**) wurden in 5 ml MeOH/Wasser (10:1) gelöst und 0,15 mmol Diazomethan langsam unter Schütteln dazugegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mittels NP-DC unter Verwendung von Laufmittel 3 und UV-Detektion (Kap. 5.16.1) verfolgt. Innerhalb von 1½ h wurden zusätzlich dreimal je 0,12 mmol Diazomethan zugegeben. Die Reaktion wurde nach 2½ h abgebrochen und der Reaktionsansatz entsprechend (Kap. 5.20.6) aufgearbeitet. Die Ausbeute betrug 8,3 mg Cervimycin C-methylester (**15**).

6 LISTE VERWENDETER LITERATUR

- Aarestrup, F.M. *Microb. Drug Resist.* **1998**, 4, 137-141.
- Alex, L.A.; Borkovich, K.A.; Simon, M.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 3416-3421.
- Anderson, A. S.; An, Z.; Strohl, W.R. In *Encyclopedia of Microbiology* Vol. 3, Lederberg, J.; Alexander, M.; Bloom, B.R.; Hopwood, D.; Hull, R.; Iglewski, B.H.; Laskin, A.J.; Oliver, S.G.; Schlaechter, M.; Summers, W.C., Eds.; Academic Press: New York, **2000**, pp773-785.
- Anonymus: *Europäisches Arzneibuch*, Amtliche deutsche Ausgabe, 3. Ausgabe (EAB 3)
- Anonymus: National Comitee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution anti-microbial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Villanova, Pa., Approved Standard Document M7-A4, NCCLS, 4. Ausgabe, **1997**.
- AOK, 2003: www.innovations-report.de/html/berichte/studien/bericht-162.
- Aoyama, T.; Naganawa, H.; Muraoka, Y.; Aoyagi, T.; Takeuchi, T. *J. Antibiot.* **1992**, 45, 1767-1772.
- Aráoz, R.; Anhalt, E.; René, L.; Badet-Denisot, M.-A.; Courvalin, P.; Badet, B. *Biochemistry* **2000**, 39, 15971-15979.
- Asleson, G.L.; Frank, C.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 6246-6248.
- Assante, G.; Carmada, L.; Merlini, L.; Nasini, G. *Phytochemistry* **1979**, 18, 311-313.
- Barrett, J.F.; Hoch, J.A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 1529-1536.
- Bassetti, M.; Melica, G.; Cenderello, G.; Rosso, R.; Di Biagio, A.; Bassetti, D. *Panminerva Medica* **2002**, 44, 179-184.
- Berdy, J. *J. Ind. Micribiol.* **1989**, 27, 3-25.
- Berlin, Yu A.; Kolosov, M.N.; Vasina, I.V.; Yartseva, I.V. *Chem Comm.* **1968**, 762-763.
- Bierman, M.; Logan, R.; O'Brien, K.; Seno, E.T.; Rao, R.N.; Schoner, B.E. *Gene* **1992**, 116, 43-49.
- Bisang, C.; Long, P.F.; Cortés, J.; Westcott, J.; Crosby, J.; Matharu, A.-L.; Cox, R.J.; Simpson, T.J.; Staunton, J.; Leadlay, P.F. *Nature* **1999**, 401, 502-505.
- Blandini, F.; Greenmayre, J.T. *Drugs Today* **1999**, 35, 473-483.
- Bockholt, H.; Udvarnoki, G.; Rohr, J.; Mocek, U.; Beale, J.M.; Floss, H.G. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2064-2069.
- Bode, H.B.; Bethe, B.; Höfs, R.; Zeeck, A. *ChemBioChem.* **2002**, 3, 619-627.
- Bolhuis, H.; van Veen, H.W.; Poolman, B.; Driessen, A.J.; Konings, W.N. *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, 21, 55-84.
- Boneca, I.G.; Chiosis, G. *Expert Opin. Ther. Targets* **2003**, 7, 311-328.
- Bryson, H.M.; Spencer, C.M. *Drugs* **1996**, 52, 406-415.

- Calendi, E.; di Marco, A.; Reggiani, M.; Scarpinato, B.; Valentini, L. *Biochimika et Biophysica* **1965**, 103, 25-49.
- Cane, D.E.; Liang, T.-C.; Kaplan, L.K.; Nallin, M.K.; Schulmann, M.D.; Hensens, O.D.; Douglas, A.W.; Albers-Schönberg, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 4110-4112.
- Casy, A.F.; Yasin, A. J. *Pharm. Biomed. Anal.* **1984**, 2, 19-36.
- Casy, A.F.; Yasin, A. J. *Magn. Reson. Chem.* **1985**, 23, 767-770.
- Celotti, M.; Fazakerley, G.V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1977**, 1319-1322.
- Chang, S.; Sievert, D.M.; Hageman, J.C. *N.Engl. J. Med.* **2003**, 348, 1342-1347.
- Chapman, T. *Nature* **2003**, 421, 661-666.
- Chopra, I.; Roberts, M.C. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, 65, 232-260.
- Clark, N.C.; Cooksey, R.C.; Hill, B.C.; Swenson, J.M.; Tenover, F.C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 2311-2317.
- Clewell, D.B.; Flannagan, S.E.; Jaworski, D.D. *Trends Microbiol.* **1995**, 3, 229-236.
- Cocito, C.; Giambattista, M.; Nyssen, E.; Vannuffel, P. *J. Antimicrobiol. Chemother.* **1997**, 39, 7-13.
- Cooper, R.D.G.; Snyder, N.J.; Zweifel, M.J.; Staszak, M.A.; Wilkie, S.C.; Nicas, T.I.; Mullen, D.L.; Butler, T.F.; Rodriguez, M.J.; Huff, B.E.; Thompson, R.C. *J. Antibiot.* **1996**, 49, 575-581.
- Cragg, G. M.; Newman, D.J.; Snader, K.M. *J.Nat.Prod.* **1997**, 60, 52-60.
- Dahse, H.-M.; Schlegel, B.; Gräfe, U. *Pharmazie* **2001**, 56, 489-491.
- Demain, A.L. ; Solomon, N.A.: *Antibiotics Containing the β -Lactam Structure*, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Bd. 1; **1983**.
- Demain, A.L. *Nature Biotechnol.* **2002**, 20, 331.
- Denoya, C.D.; Fedechko, R.W.; Hafner, E.W.; McArthur, H.A.I.; Morgenstern, M.R.; Skinner, D.B.; Stutzman-Engwall, K.; Wax, R.G.; Wernau, W.C. *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 3504-3511.
- Devasthale P.V.; Mitscher, L.A.; Telikepalli, H.; Vander Velde, D.; Zou, J.-Y.; Ax, H.A.; Thymiak, A.A. *J. Antibiot.* **1992**, 45, 1907-1913.
- Eistert, B.; Geiss, F. *Chem. Ber.* **1961**, 94, 929-47.
- European Pharmacopoeia* 4, 2002.
- Fiedler, H.-P. *Nat. Prod. Lett.* **1993**, 2, 119-128.
- Fleming, A. *Brit. J. Exptl. Pathol.* **1929**, 10, 226-236.
- Forsen, S.; Merenyi, F.; Nilsson, M. *Acta Chem. Scand.* **1967**, 21, 620-624.
- Friebolin, H. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*; VHC Verlagsgesellschaft: Weinheim, 2. Aufl., **1992**.

- Frolova, I.V.; Rosenfeld, G.S.; Listvinova, S.N. *Antibiotiki* **1971**, 16, 687-691.
- Fu, H.; Hopwood, D.A.; Khosla, C. *Chem. Biol.* **1994**, 1, 205-210.
- Funa, N.; Ohnishi, Y.; Fujii, I.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y.; Horinouchi, S. *Nature* **1999**, 400, 897-899.
- Furui, M.; Takashima, J.; Sudo, K.; Noriko, C.; Sashita, R. *JP 06339395A*; **1994**.
- Gao, Y. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 100-101.
- Gerth, K.; Steinmetz, H.; Hofle, G.; Reichenbach, H. *J. Antibiot.* **2000**, 53, 1373-1377.
- Gomi, S.; Sasaki, T.; Itoh, J.; Sezaki, M. *J. Antibiot.* **1988**, 41, 425-432.
- Gonzales, R.D.; Schreckenberger, P.C.; Graham, M.B.; Kelkar, S.; DenBesten, K.; Quinn, J.P. *Lancet* **2001**, 357, 1179-1180.
- Gräfe, U.: *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, New York, **1992**.
- Groth, I.; Schumann, P.; Laiz, L.; Sanchez-Moral, S.; Cañaveras, J.C. ; Saiz-Jimenez, C. *Geomicrobiology Journal* **2001**, 18, 241-258.
- Hafner, E.W.; Holley, B.W.; Holdom, K.S.; Lee, S.E.; Wax, R.G.; Beck, D.; McArthur, H.A.I.; Wernau, W.C. *J. Antibiot.* **1991**, 44, 349-356.
- Haines, A.H. *Carbohydrate Research* **1972**, 21, 99-109.
- Harvey, A. *Drug Discovery* **2000**, 5, 294-300.
- HKI-Methodenkatalog zur Testung von Reinsubstanzen, **1998**.
- Hlavka, J.J.; Boothe, J.H.: *The Tetracyclines (Handbook of experimental pharmacology, vol. 78)*, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, **1985**.
- Hochstein, F.A.; Schach v. Wittenau, M.; Tanner jr., F.W.; Murai, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 5934-5937.
- Hofle, G.; Wolf, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 835-843.
- Hori, H.; Higashi, K.; Ishyama, T.; Uramoto, M.; Uehara, Y.; Oki, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 2785-2788.
- Hutchinson, C.R.; Fujii, I. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 201-238.
- Ishimaru, T.; Tsuboya, S.; Saijo, T. *JP0640995A* **1994**.
- Ivanova, V.; Gushterova, A. *J. Antibiot.* **1997**, 50, 965-969.
- Jeffs, P.W.; McWilliams, D.J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 6185-6192.
- Jork, H.; Funk, W.; Fischer, W.; Wimmer, H. In *Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden* Band 1a; VHC Verlagsgesellschaft: Weinheim, **1989**, pp195-198; pp407-409.
- Kabuto, C.; Silvertown, J.V.; Akiyama, T.; Sankawa, U.; Hutchinson, R.D.; Steyn, P.S.; Vlegaar, R.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, 728-729.

- Kajiura, T.; Furumai, T.; Igarashi, Y.; Hori, H.; Higashi, K.; Ishyama, T. Uramoto, M.; Uehara, Y.; Oki, T. *J. Antibiot.* **2002**, 55, 53-60.
- Kaneda, T. *Micribiol. Rev.* **1991**, 55, 288-302.
- Kayser, F.H.; Bienz, K.A.; Eckert, J.; Zinknagel, R.M.: *Medizinisch Mikrobiologie:verstehen, lernen, nachschlagen*, Thieme-Verlag: Stuttgart, **1998**.
- Kieser, T.; Bibb, M.J.; Buttner, M.J., Chater, K.F.; Hopwood, D.A. 'Practical Streptomyces Genetics', The John Innes Foundation **2000**.
- Kleinkauf, H.; v. Döhren, H. In *Biotechnology*, Pape, H.; Rehm, H.J., Eds.; VCH: Weinheim, Bd. 4; **1986**, pp 291-298.
- Knippers, Rolf: *Molekulare Genetik*, Thieme-Verlag: Stuttgart, New York, 8. Aufl., **2001**.
- Kramer, P.J.; Zawada, J.X.; McDaniel, R.; Hutchinson, C.R.; Hopwood, D.A.; Khosla, C. *J. Am. Chem Soc.* **1997**, 119, 635-639.
- Kubinyi, H. *Pharmazie* **1995**, 50, 647-662.
- Kunnari, T.; Klika, K.D.; Blanco, G.; Méndez, C.; Mäntsälä, P.; Hakala, J.; Sillanpää, R.; Tähtinen, P.; Salas, J.; Ylihonko, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1* **2002**, 1818-1825.
- Lancini, G.; Parent, F.: *Antibiotics: An Integrated View*, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, **1982**.
- Lancini, G.; Parenti, F.; Gallo, G.G.: *Antibiotics A Multidisciplinary Approach*, Plenum Press: New York, 2. Aufl., **1995**.
- Leclercq, R.; Derlot, E.; Duval, J., Courvalin, P. *N.Engl. J. Med.* **1988**, 319, 157-161.
- Macielag, M.J.; Demers, J.P.; Fraga-Spano, S.A.; Hlasta, D.J.; Johnson, S.G. ; Kanojia, R.M.; Russell, R.K.; Sui, Z.; Weidner-Wells, M.A.; Werblood, H.; Foleno, B.D.; Goldschmidt, R.M.; Loeloff, M.J.; Webb, G.C.; Barrett, J.F. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2939-2945.
- Markarevich, V.G.; Gaziyan, N.R. *Antibiotiki* **1971**, 16, 22-27.
- Marshall, C.G. ; Zolli, M.; Wright, G.D. *Biochemistry* **1999**, 38, 8485-8491.
- Marti, T.; Hu, Z.; Pohl, N.L.; Shah, A.N.; Khosla, C. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 33443-33448.
- McCormick, J.R.D.; Miller, P.A.; Johnson, S.; Arnold, N.; Sjolander, N.O. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 3023-3025.
- McDaniel, R.; Ebert-Khosla, S.; Fu, H.; Hopwood, D.A.; Khosla, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994^{a)}**, 91, 11542-11546.
- McDaniel, R.; Ebert-Khosla, S.; Hopwood, D.A.; Khosla, C. *J. Am. Chem Soc.* **1994^{b)}**, 116, 10855-1089.
- Mikami, Y.; Komaki, H.; Imai, T.; Yazawa, K.; Nemoto, A.; Tanaka, Y.; Gräfe, U. *J. Antibiot.* **2000**, 53, 70-74.
- Miller, M.W.; Hochstein, F.A. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 2525-2528.

- Mitscher, L.A.; Bonacci, A.C.; Sokoloski, T.D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1970**, 8, 78-86.
- Mitscher, L.A.; Sharma, P.N.; Chu, D.T.W.; Shen, L.L.; Pernet, A.G. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 2283-2286.
- Mitteilungen der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention am Robert-Koch-Institut Berlin *Epidemiologisches Bulletin* **1998**, 50, 358-359.
- Moibroek, S.; Wasylishen, R.E. *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 357-362.
- Momose, I.; Chen, W.; Nakamura, H.; Naganawa, H.; Iinuma, H.; Takeuchi, T. *J Antibiot.* **1998^{a)}**, 51, 26-32.
- Momose, I.; Chen, W.; Kinoshita, N.; Iinuma, H.; Hamada, M.; Takeuchi, T. *J Antibiot.* **1998^{b)}**, 51, 21-25.
- Moore, B.S.; Hertweck, C. *Nat. Prod. Report.* **2002**, 19, 70-99.
- Müller, H.; Brackhagen, O.; Brunne, R.; Henkel, T.; Reichel, F. In *The Role of Natural Products in Drug Discovery*, Mulzer, J.; Bohlmann, R., Eds.; Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, **2000**, pp 205-216.
- Munder, T.; Nincovic, M.; Rudakoff, B. *Biotech. Annu. Rev.* **1997**, 3, 31-57.
- Neu, H.C. *Science* **1992**, 257, 1064-1073.
- Nicas, T.I.; Mullen, D.L.; Flokowitsch, J.E.; Preston, D.A.; Snyder, N.J.; Zweifel, M.J.; Wilkie, S.C.; Rodriguez, M.J.; Thompson, R.C.; Cooper, R.D.G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 2194-2199.
- Okabe, T.; Funaishi, K.; Masayuki, H.; Kawamura, K.; Suda, H.; Sato, F.; Okanishi, M. *JP 02291287A2*, **1990**.
- Omura, S.; Ikeda, H.; Tanaka, H. *J. Antibiot.* **1991**, 44, 560-563.
- Organikum*, Deutscher Verlag der Wissenschaften: Berlin, 9. Aufl. **1993**.
- Othersen, O. G.; Beierlein, F.; Lanig, H.; Clark, T. *J. Phys. Chem.* **2003**, 107, 13743-13749.
- Palenik, G.J.; Mathew, M.; Restivo, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4458-4464.
- Paululat, T.; Zeeck, A.; Gutterer, J.; Fiedler, H.-P. *J. Antibiot.* **1999**, 52, 96-101.
- Petkovic, H.; Thamchaipenet, A.; Zhou, L.-H.; Hranueli, D.; Raspor, P.; Waterman, P.G.; Hunter, I.S. *J. Bio. Chem.* **1999**, 274, 32829-32834.
- Priebe, W.: *Anthracycline Antibiotics*, American Chemical Society: Washington DC, **1993**.
- Rasmussen, B.; Noller, H.F.; Daubresse, G.; Oliva, B.; Misulovin, Z.; Rothstein, D.M.; Ellestad, G.A.; Gluzman, Y.; Tally, F.P.; Chopra, I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, 35, 2306-2311.
- Roberts, M.C. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, 36, 462-467.
- Rösecke, J.; König, W.A. *Phytochemistry* **1999**, 52, 1621-1627.

- Saito, K.; Yamaguchi, T.B. *Chem. Soc. Jpn.* **1978**, 51, 651-652.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y., 3. Aufl., **2001**.
- Schach von Wittenau, M.; Blackwood, R.K. *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 613-615.
- Schmidt, Karen Dissertation **2002**.
- Schmidtke, M.; Schnittler U., Jahn, B.; Dahse, H. M.; Stelzner, A. *J. Virol. Meth.* **2001**, 95, 133-143.
- Schütz, H.; Gollmick, F.A.; Stutter, E. *Studia Biophysica* **1979**, 75, 147-159.
- Schulmann, M.D.; Valentino, D.; Hensens, O. *J. Antibiot.* **1986**, 39, 541-549.
- Schwabe, U.; Paffrath, D.: *Arzneiverordnungs-Report 2003*, Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, **2003**.
- Shen, B.; Summers, G.; Wendt-Pienkowski, E.; Hutchinson, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6811-6821.
- Shimada, H.; Noguchi, H.; Iitaka, Y.; Sankawa, U.; *Heterocycles* **1981**, 15, 1141-1146.
- Shnyreva, M.; Munder, Th. *J. Virol.* **1996**, 70, 7478-7884.
- Shu, Y. ; Cutrone, J. Q.; Klotz, S. E.; Huang, S. *J Antibiot.* **1995**, 48, 1060-1065.
- Sonntag, H.-G. *Spektrum der Wissenschaft, Dossier: Seuchen*, **1997**.
- Staunton, J.; Weissman, K.J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 380-416.
- Steglich, W. *Pure. Appl. Chem.* **1981**, 53, 1233-1240.
- Stevens, C.L.; Blumbergs, P.; Wood, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 3952-3954.
- Steyn, P.S.; Wessels, P.L. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3667-3670.
- Stezowski, J.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 6012-6018.
- Sum, P.-E.; Sum, F.-W.; Projan, S.J. *Curr. Pharm. Design* **1998**, 4, 119-132.
- The Celera Genomics Sequencing Team *Science* **2001**, 291, 1304-1351.
- Thomas, R. *ChemBioChem* **2001**, 2, 612-627.
- Thomas, R.; Williams, D.J.J. *J.Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 128-130.
- Tsiodras, S.; Gold, H.S.; Sakoulas, G.; Eliopoulos, G.M.; Wennersten, C.; Venkataraman, L.; Moellering, R.C.; Ferraro, M.J. *Lancet* **2001**, 358, 207-208.
- Tulp, M.; Bohlin, L. *Trends in Pharmaceutical Sciences* **2002**, 23, 225-231.
- Ulijasz, A.T.; Weisblum, B. *J Bacteriol.* **1999**, 181, 627-631.
- Ulijasz, A.T.; Kay, B.K.; Weisblum, B. *Biochemistry* **2000**, 39, 11417-11424.
- Umezawa, H.; Hooper, I.R.: *Aminoglycoside Antibiotics*, Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, **1982**.
- Urones, J.G.; Marcos, I.S.; Cubillo, L.; Monje, V.A.; Hernández, J.M.; Basabe, P. *Phytochemistry* **1989**, 28, 651-653.

- Vanek, Z.; Majer, J. In *Antibiotics*, Gottlieb, D.; Shaw, P.D., Eds.; Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Bd. 2; **1967**, pp 154-188.
- von Dreele, R.B.; Hughes, R.E. *J. Amer. Chem. Soc.* **1971**, 93, 7290-7296.
- Voss, A.; Milatovic, D.; Wallrauch-Schwarz, C.; Rosdahl, V.T.; Braveny, I. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1994**, 13, 50-55.
- Vouillamoz, J.; Entenza, J.M.; Feger, C.; Glauser, M.P.; Moreillon, P. *Antimicrob. Agents. Chemther.* **2000**, 44, 1789-1795.
- Wagenvoort, J.H.T. *Hygiene und Medizin* **1999**, 24, 65-70.
- Walsh, C.T. *Science*, **1993**, 261, 308-309.
- Watve, M.G.; Tickoo, R.; Jog, M.M.; Bhole, B.D. *Arch. Microbiol.* **2001**, 176, 386-390.
- Whitener, C.J.; Park, S.Y.; Browne, F.A.; Parent, L.J.; Julian, K.; Bozdogan, B.; Appelbaum, P.C.; Chaitram, J.; Weigel, L.M.; Jernigan, J.; McDougal, L.K.; Tenover, F.C.; Fridkin, S.K. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, 38, 1049-1055.
- WHO Communicable Disease Surveillance and Response (1999) Containing antimicrobial resistance: review of the literature and report of a WHO workshop on the development of a global strategy for the containment of antimicrobial resistance. Geneva/ Switzerland. WHO/CDS/CSR/DRS **1999**.
- WHO, 2002: www.who.int/infectious-disease-news/cds2002/intro.pdf
- Wiedemann, B. *Internist* **2000**, 41, 1205-1211.
- Wilhelm, M.P.; Estes, L. *Mayo. Clin. Proc.* **1999**, 74, 928-935.
- Williams, D.H.; Bardsley, B. *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1264-1286.
- Wolfender, J.-L.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K. *J. Chromatogr.* **2003**, 66, 1022-1037.
- Xuan, L.; Xu, S.; Zhang, H. ; Xu, Y. *J. Antibiot.* **1992**, 45, 1974-1976.
- Zaehner, H.; Fiedler, H.-P. In *Fifty years of antimicrobials: past perspective and Future trends*, Hunter, P.D.; Darby, G.K.; Russell, N.J., Eds.; Cambridge University Press, SGM Symposium 53; **1995**, pp 67-85.

7. LISTE WISSENSCHAFTLICHER BEITRÄGE

Veröffentlichungen:

Herold, K.; Xu, Z.; Gollmick, F.A.; Gräfe, U.; Hertweck, C.

Biosynthesis of cervimycin C, an aromatic polyketide antibiotic bearing an unusual dimethylmalonyl moiety. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2411-2414.

Herold, K.; Gräfe, U.; Möllmann, U.; Roth, M.; Groth, I.; Gollmick, F.A.;

HKI10311129, neues Antibiotikum, Verfahren zu dessen Herstellung und dessen Verwendung. DE Pat.anm. Akz. 10 2004 010 219.8-43.

Schlegel, B.; Groth, I.; Herold, K.; Möllmann, U.; Leistner, E.

Isolation and antibiotic activity of a benzoylpyrrole antibiotic produced Streptomyces species HKI QuH8 (DSM 14527). Ger Offen (2003), 6pp. CODEN: GWXXBX DE 10151215A1 20030424 CAN 138: 334316 AN 2003: 317397.

Herold, K.; Groth, I.; Möllmann, U.; Roth, M.; Gollmick, F.A.; Gräfe, U.; Hertweck, C.

Cervimycin A-D, a polyketide glycoside complex from a cave bacterium. in Vorbereitung.

Vorträge:

Altamiramycine, antibakterielle Chromoglykoside aus Höhlen-Actinomyceten.

Tübinger-Göttinger Gespräche zur Chemie von Mikroorganismen; Blaubeuren, 2001.

Cervimycin, ein Chromoglykosid-Komplex aus einem Höhlen-Streptomyceten.

15. Irseer Naturstofftage der DECHEMA e.V.; Irsee, 2003.

Posterbeiträge:

Cervimycin, ein Chromoglykosid-Komplex aus einem Höhlen-Streptomyceten.

15. Irseer Naturstofftage der DECHEMA e.V.; Irsee, 2003.

8. ANHANG

Physikochemische Daten der Substanzen

Substanz 1 (Cervimycin A)

2-Acetyl-3,11-dihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-12a-[O-2,3,6-tridesoxy-*b*-D-*erythro*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-*b*-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-4-[O-2,3,6-tridesoxy-4-O-(2-dimethyl-malon-1-yl)-*a*-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-*a*-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-*a*-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-*b*-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen.

Oranges Pulver; $[\alpha]^{22}_{\text{D}} + 35,2^\circ$ (c 0,96; MeOH); Smp. 156 – 158 °C; UV (MeOH) λ_{max} (ϵ in cm^2/Mol) 240 nm ($3,38 \cdot 10^7$), 277 nm ($2,57 \cdot 10^7$), 434 nm ($5,66 \cdot 10^6$); UV (MeOH+NaOH) λ_{max} (ϵ in cm^2/Mol) 204 ($8,79 \cdot 10^7$), 251 ($2,74 \cdot 10^7$), 277 ($2,58 \cdot 10^7$), 566 ($6,99 \cdot 10^6$); IR (Film) ν_{max} (cm^{-1}) 857, 911, 1001, 1024, 1068, 1114, 1163, 1225, 1248, 1269, 1377, 1458, 1593, 1626, 1688, 1730, 2853, 2923, 2954, 3568; ESIMS (pos.) m/z 1249 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 1225 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ESIMSⁿ (pos.) m/z 1021 $[\text{M}+\text{Na}-2 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$, 679 $[\text{M}+\text{Na}-5 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$, 593 $[5 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2+\text{Na}]^+$, 451 $[\text{M}+\text{Na}-7 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$; HRESIMS m/z 1249,5046 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{62}\text{H}_{82}\text{NaO}_{25}]$ 1249,5043); NMR Daten s. **Tab. 12** im Anhang.

Substanz 2 (Cervimycin B)

2-Acetyl-3,11-dihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-12a-[O-2,3,6-tridesoxy-*b*-D-*erythro*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-*b*-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-4-[O-2,3,6-tridesoxy-4-O-(2-methyl-malon-1-yl)-*a*-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-*a*-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-*a*-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-*b*-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen.

Oranges Pulver; $[\alpha]^{22}_{\text{D}} + 26,0^\circ$ (c 0,55; MeOH); Smp. 132 – 134 °C; UV (MeOH) λ_{max} (ϵ in cm^2/Mol) 239 nm ($5,00 \cdot 10^7$), 280 nm ($3,65 \cdot 10^7$), 434 nm ($5,53 \cdot 10^6$); IR (Film) ν_{max} (cm^{-1}) 776, 801, 855, 906, 999, 1023, 1066, 1111, 1224, 1247, 1353, 1378, 1447, 1593, 1625, 1686, 1730, 2871, 2929; ESIMS (pos.) m/z 1235 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 1211 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ESIMSⁿ (pos.) m/z 1007 $[\text{M}+\text{Na}-2 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$, 679 $[\text{M}+\text{Na}-4 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2-\text{MMMS}]^+$, 579 $[4 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2+\text{MMMS}+\text{Na}]^+$, 451 $[\text{M}+\text{Na}-6 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2-\text{MMMS}]^+$; HRESIMS m/z 1235,4909 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{61}\text{H}_{80}\text{NaO}_{25}]$ 1235,4887); NMR Daten s. **Tab. 13** im Anhang.

Substanz 3 (Cervimycin C)

3,11-Dihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-12a-[O-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-4-[O-2,3,6-tridesoxy-4-O-(2-dimethyl-malon-1-yl)-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen-2-carboxamid.

Oranges Pulver; $[\alpha]_D^{22} + 26,5^\circ$ (c 0,51; MeOH); Smp. 167 – 168 °C; UV (MeOH) λ_{\max} (ϵ in cm^2/Mol) 242nm ($4,54 \cdot 10^7$), 434 nm ($6,83 \cdot 10^6$); UV (MeOH+NaOH) λ_{\max} (ϵ in cm^2/Mol) 203 ($8,78 \cdot 10^7$), 249 ($3,64 \cdot 10^7$), 273 ($2,91 \cdot 10^7$), 563 ($6,41 \cdot 10^6$); IR (Film) ν_{\max} (cm^{-1}) 751, 805, 857, 911, 997, 1022, 1063, 1112, 1162, 1224, 1247, 1376, 1457, 1567, 1593, 1626, 1686, 1727, 2854, 2922, 2953, 3351; ESIMS (pos.) m/z 1250 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 1226 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ESIMSⁿ (pos.) m/z 1022 $[\text{M}+\text{Na}-2 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$, 680 $[\text{M}+\text{Na}-5 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$, 593 $[5 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2+\text{Na}]^+$, 452 $[\text{M}+\text{Na}-7 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$; HRESIMS m/z 1250,5002 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{61}\text{H}_{81}\text{NaNO}_{25}]$ 1250,4995); NMR Daten s. **Tab. 14** im Anhang.

Substanz 4 (Cervimycin D)

3,11-Dihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-12a-[O-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-4-[O-2,3,6-tridesoxy-4-O-(2-methyl-malon-1-yl)-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen-2-carboxamid.

Oranges Pulver; $[\alpha]_D^{22} + 39,9^\circ$ (c 0,60; MeOH); Smp. 158 – 160 °C; UV (MeOH) λ_{\max} (ϵ in cm^2/Mol) 242 nm ($2,84 \cdot 10^7$), 434 nm ($4,10 \cdot 10^6$); IR (Film) ν_{\max} (cm^{-1}) 751, 784, 857, 905, 952, 984, 978, 1019, 1065, 1112, 1164, 1224, 1247, 1352, 1378, 1447, 1482, 1593, 1625, 1687, 1729, 2872, 2932; ESIMS (pos.) m/z 1236 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 1212 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ESIMSⁿ (pos.) m/z 1008 $[\text{M}+\text{Na}-2 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$, 680 $[\text{M}+\text{Na}-4 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2-\text{MMMS}]^+$, 579 $[4 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2+\text{MMMS}+\text{Na}]^+$, 452 $[\text{M}+\text{Na}-6 \times \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2-\text{MMMS}]^+$; HRESIMS m/z 1236,4857 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{60}\text{H}_{79}\text{NaNO}_{25}]$ 1236,4839); NMR Daten s. **Tab. 15** im Anhang

Substanz 5 (Cervimycin E)

2-Acetyl-3,4,11,12a-tetrahydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen.

Oranges Pulver (sehr empfindlich); $[\alpha]^{22}_{\text{D}}$ und UV n.b. (unlöslich oder instabil in relevanten LM); Smp. 177 – 183 °C; IR (Pulver) ν_{max} (cm^{-1}) 769, 853, 874, 939, 1002, 1040, 1099, 1240, 1275, 1315, 1369, 1447, 1585, 1623; ESIMS (neg.) m/z 427 $[\text{M-H}]^-$; NMR Daten s. **Tab. 16** im Anhang.

Substanz 6 (Cervimycin F)

3,4,11,12a-Tetrahydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen-2-carboxamid.

Oranges Pulver; $[\alpha]^{22}_{\text{D}} + 86,8^\circ$ (c 0,13; Pyridin); Smp. 205 – 208 °C; UV (unlöslich in relevanten LM); IR (Pulver) ν_{max} (cm^{-1}) 787, 811, 853, 888, 950, 970, 997, 1040, 1078, 1112, 1146, 1165, 1180, 1219, 1246, 1268, 1310, 1351, 1370, 1385, 1417, 1456, 1485, 1518, 1587, 1618, 1669, 3235, 3260, 3370; ESIMS (pos.) m/z 452 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 428 $[\text{M-H}]^-$; HRESIMS m/z 414,0579 $[\text{M-NH}_2+\text{H}]$ (berechnet für $[\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_{10}]$ 414,0571); NMR Daten s. **Tab. 16** im Anhang.

Substanz 7 (Cervimycin G)

3,11,12a-Trihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-4-[O-2,3,6-tridesoxy-*b*-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12, 12a-octahydronaphthacen-2-carboxamid.

Oranges Pulver; $[\alpha]^{22}_{\text{D}} + 81,0^\circ$ (c 0,84; MeOH); Smp. > 213 °C unter Zersetzung; UV (MeOH) λ_{max} (ϵ in cm^2/Mol) 241 nm ($1,42 \cdot 10^7$); 432 nm ($2,03 \cdot 10^6$); IR (Pulver) ν_{max} (cm^{-1}) 787, 818, 857, 915, 994, 1023, 1045, 1109, 1163, 1222, 1246, 1268, 1349, 1372, 1419, 1455, 1480, 1592, 1624, 1684, 2849, 2917; ESIMS (pos.) m/z 566 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 542 $[\text{M-H}]^-$; HRESIMS m/z 566,1330 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NaNO}_{12}]$ 566,1274); NMR Daten s. **Tab. 17** im Anhang.

Substanz 8 (Cervimycin H)

3,11-Dihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-4-[O-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-12a-[O-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen-2-carboxamid.

Oranges Pulver; $[\alpha]^{22}_{\text{D}} + 106,2^\circ$ (c 0,55; MeOH); Smp. 168 - 171 °C; UV (MeOH) λ_{max} (ϵ in cm^2/Mol) 242 nm ($3,24 \cdot 10^7$); 434 nm ($4,66 \cdot 10^6$); IR (Film) ν_{max} (cm^{-1}) 785, 860, 893, 950, 985, 1053, 1112, 1163, 1226, 1247, 1269, 1350, 1374, 1456, 1475, 1568, 1593, 1625, 1685, 2869, 2935 ESIMS (pos.) m/z 794 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 770 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRESIMS m/z 794,2641 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{NaNO}_{16}]$ 794,2636); NMR Daten s. **Tab. 18** im Anhang.

Substanz 9 (Cervimycin I)

3,11-Dihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-4-[O-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-12a-[O-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen-2-carboxamid.

Oranges Pulver; $[\alpha]^{22}_{\text{D}} + 110,7^\circ$ (c 0,47; MeOH); Smp. 177 – 178 °C; UV (MeOH) λ_{max} (ϵ in cm^2/Mol) 243 nm ($5,86 \cdot 10^7$); 436 nm ($6,25 \cdot 10^6$); IR (Film) ν_{max} (cm^{-1}) 785, 803, 858, 910, 978, 1016, 1035, 1050, 1112, 1163, 1225, 1247, 1269, 1351, 1373, 1454, 1560, 1592, 1624, 1685, 2886, 2936; ESIMS (pos.) m/z 908 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 884 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRESIMS m/z 908,3317 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{44}\text{H}_{55}\text{NaNO}_{18}]$ 908,3317); NMR Daten s. **Tab. 19** im Anhang.

Substanz 10 (Cervimycin J)

3,11,12a-Trihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-4-[O-2,3,6-tridesoxy-4-O-(2-dimethylmalon-1-yl)-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen-2-carboxamid.

Oranges Pulver; $[\alpha]^{22}_{\text{D}} + 36,2^\circ$ (c 1,47; MeOH); Smp. 165 – 168 °C; UV (MeOH) λ_{max} (ϵ in cm^2/Mol) 241 nm ($2,54 \cdot 10^7$); 433 nm ($3,54 \cdot 10^6$); IR (Film) ν_{max} (cm^{-1}) 789, 812, 855, 914, 951, 998, 1068, 1111, 1223, 1247, 1271, 1351, 1381, 1455, 1560, 1592, 1625, 1652, 1686, 1729, 2851, 2921; ESIMS (pos.) m/z 1022 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 998 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRESIMS m/z 1022,3661 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{49}\text{H}_{61}\text{NaNO}_{21}]$ 1022,3634); NMR Daten s. **Tab. 20** im Anhang.

Substanz 11 (Cervimycin K)

3,11-Dihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-12a-[O-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-4-[O-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen-2-carboxamid.

Oranges Pulver; $[\alpha]_D^{22} + 15,1^\circ$ (c 0,41; MeOH); Smp. 155 – 159 °C; UV (MeOH) λ_{\max} (ϵ in cm^2/Mol) 242 nm ($1,50 \cdot 10^7$); 434 nm ($1,98 \cdot 10^6$); IR (Film) ν_{\max} (cm^{-1}) 858, 916, 997, 1053, 1112, 1163, 1225, 1247, 1351, 1377, 1448, 1592, 1625, 1686, 2853, 2922, 3417; ESIMS (pos.) m/z 1136 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 1112 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRESIMS m/z 1136,4707 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{56}\text{H}_{75}\text{NaNO}_{22}]$ 1136,4678); NMR Daten s. **Tab. 21** im Anhang.

Substanz 12 (Cervimycin L)

2-Acetyl-3,11,12a-trihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-4-[O-2,3,6-tridesoxy-4-O-(2-dimethyl-malon-1-yl)-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen.

Oranges Pulver; $[\alpha]_D^{22} + 21,3^\circ$ (c 0,46; MeOH); Smp. 113 – 117 °C; UV (MeOH) λ_{\max} (ϵ in cm^2/Mol) 239 nm ($2,53 \cdot 10^7$); 280 nm ($1,69 \cdot 10^7$); 431 ($4,22 \cdot 10^6$); IR (Film) ν_{\max} (cm^{-1}) 800, 857, 1001, 1069, 1113, 1222, 1248, 1269, 1378, 1454, 1593, 1624, 1686, 1728, 2853, 2923, 2955; ESIMS (pos.) m/z 1021 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 997 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRESIMS m/z 1021,3679 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{50}\text{H}_{62}\text{NaO}_{21}]$ 1021,3681); NMR Daten s. **Tab. 22** im Anhang.

Substanz 13 (Cervimycin M)

2-Acetyl-3,11,12a-trihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-4-[O-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octa-hydronaphthacen.

Oranges Pulver; $[\alpha]_D^{22} + 101,43^\circ$ (c 0,14; MeOH); Smp. > 185 °C; UV (MeOH) λ_{\max} (ϵ in cm^2/Mol) 239 nm ($9,65 \cdot 10^6$); 277 nm ($7,4 \cdot 10^6$); 431 ($1,48 \cdot 10^6$); IR (Film) ν_{\max} (cm^{-1}) 866, 918, 999, 1067, 1112, 1166, 1226, 1248, 1270, 1351, 1375, 1417, 1474, 1488, 1540, 1557, 1594, 1624, 1653, 1684, 2945; ESIMS (pos.) m/z 565 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 587 $[(\text{M}-\text{H}+\text{Na})+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 541 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRESIMS m/z 565,1326 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{NaO}_{12}]$ 565,1322); NMR Daten s. **Tab. 17** im Anhang.

Substanz 14 (Cervimycin A-methylester)

2-Acetyl-3,11-dihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-12a-[O-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-4-[O-2,3,6-tridesoxy-4-O-(methyl-2-dimethyl-malon-1-yl)-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen.

Oranges Pulver; $[\alpha]_D^{22} + 13,8^\circ$ (c 0,42; MeOH); Smp. 106 – 109 °C; UV (MeOH) λ_{\max} (ϵ in cm^2/Mol) 240 nm ($2,22 \cdot 10^7$); 276 nm ($1,74 \cdot 10^7$); 435 ($3,51 \cdot 10^6$); IR (Pulver) ν_{\max} (cm^{-1}) 777, 800, 857, 910, 955, 985, 999, 1023, 1066, 1113, 1166, 1225, 1248, 1269, 1352, 1379, 1446, 1593, 1625, 1686, 1730, 2851, 2864, 2924, 2950; ESIMS (pos.) m/z 1263 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1285 $[(\text{M}-\text{H}+\text{Na})+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 1239 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRESIMS m/z 1263,5200 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{63}\text{H}_{84}\text{NaO}_{25}]$ 1263,5194); NMR Daten s. **Tab. 23** im Anhang.

Substanz 15 (Cervimycin C-methylester)

3,11-Dihydroxy-8-methoxy-1,7,10,12-tetraoxo-12a-[O-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-4-[O-2,3,6-tridesoxy-4-O-(methyl-2-dimethyl-malon-1-yl)-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**a**-L-*threo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,3,6-tridesoxy-**b**-D-*erythro*-hexapyranosyl-1-oxy]-1,4,4a,5,7,10,12,12a-octahydronaphthacen-2-carboxamid.

Oranges Pulver; $[\alpha]_D^{22} + 52,5^\circ$ (c 0,40; MeOH); Smp. 138 – 140 °C; UV (MeOH) λ_{\max} (ϵ in cm^2/Mol) 242 nm ($2,73 \cdot 10^7$); 434 nm ($3,88 \cdot 10^6$); IR (Pulver) ν_{\max} (cm^{-1}) 802, 859, 910, 953, 985, 999, 1022, 1052, 1066, 1111, 1165, 1225, 1250, 1260, 1352, 1380, 1446, 1482, 1593, 1626, 1687, 1730, 2871, 2932, 2958; ESIMS (pos.) m/z 1264 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (neg.) m/z 1241 $[\text{M}]^-$; HRESIMS m/z 1264,5161 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{62}\text{H}_{83}\text{NaNO}_{25}]$ 1264,5152); NMR Daten s. **Tab. 24** im Anhang.

NMR Daten der Cervimycine

Tab.12 ¹H und ¹³C NMR Daten von Cervimycin A (1), gemessen in Pyridin-*d*₅.

Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	193,58*	-		4B	74,86	3,52 ^b m	
2	113,83	-		5B	67,04	3,97q (6,5)	
3	190,79*	-		6B	17,34	1,21d (6,6)	
3-OH	-	18,03brs CDCl ₃ ^c		1C	99,55	5,00brs	α
4	74,21	4,70d (12,0)		2C	25,05	1,62 ^b m / 2,03 ^b m	
4a	42,79	3,54 ^b m		3C	24,74	1,82 ^b m / 2,21 ^b m	
5	28,58	3,90wd (18,7) / 4,33dd (18,7; 5,3)		4C	74,97	3,55 ^b m	
5a	153,15	-		5C	67,22	4,05q (6,6)	
6	120,18	7,68s		6C	17,34	1,16d (6,6)	
6a	134,00	-		1D	99,22	4,89brs	α
7	179,04	-		2D	24,53	1,60 ^b m / 2,02 ^b m	
8	161,19	-		3D	23,12	1,93 ^b m / 2,12 ^b m	
9	110,43	6,36s		4D	70,46	5,02 ^b m	
10	190,57	-		5D	65,97	4,21q (6,6)	
10a	112,97	-		6D	17,22	1,25d (6,6)	
11	163,27	-		1E	99,92	5,17m	
11-OH	-	13,39s CDCl ₃ ^c				4,60d (9,4) CDCl ₃ ^c	β
11a	125,26	-		2E	31,64	1,80 ^b m / 2,55m	
12	189,42	-		3E	30,83	1,69 ^b m / 2,45m	
12a	86,25	-		4E	79,62	3,36m	
13	56,77	3,76s		5E	75,39	3,62qd (9,1; 6,1)	
14	202,77	-		6E	18,52	1,38d (6,2)	
15	29,03	2,71s		1F	103,33	4,63dd (8,9; 1,8)	β
1A	102,55	5,03 ^b m 4,64d (9,8) CDCl ₃ ^c	β	2F	31,99	1,64 ^b m / 2,15 ^b m	
2A	30,82	1,75 ^b m / 2,25 ^b m		3F	31,63	1,85 ^b m / 2,12 ^b m	
3A	29,75	1,60 ^b m / 2,22 ^b m		4F	71,08	3,44m	
4A	78,99	3,27 ^b m		5F	76,68	3,52 ^b m	
5A	74,87	3,27 ^b m		6F	18,79	1,46d (5,9)	
6A	18,28	0,97d (5,0)		1'	173,40	-	
1B	99,28	4,96brs	α	2'	50,62	-	
2B	25,18	1,52 ^b m / 2,12 ^b m		3'	23,25	1,71s	
3B	24,88	1,85 ^b m / 1,96 ^b m		4'	23,32	1,72s	
				5'	175,50	-	
				5'-OH	-	12,60brs DMSO- <i>d</i> ₆ ^c	

¹H und ¹³C-Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung nicht gemäß IUPAC-Regeln; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; ^c in CDCl₃ oder DMSO-*d*₆ gemessene Signale; KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker; Multiplizitäten: m Multiplett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett; * austauschbare Signale.

Tab.13 ¹H und ¹³C NMR Daten von Cervimycin B (2), gemessen in Pyridin-*d*₅.

Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	193,25*	-		1C	99,18	5,05brs	α
2	113,32	-		2C	24,71	1,65 ^b m / 2,02 ^b m	
3	190,48*	-		3C	24,38	1,85 ^b m / 2,23 ^b m	
3-OH	-	n.d.		4C	74,68	3,51 ^b m	
4	73,75	4,72d (11,9)		5C	66,84	4,07q (6,4)	
4a	42,43	3,55 ^b m		6C	16,97	1,18dd (6,4)	
5	28,19	3,93 ^b m / 4,35dd (18,7; 5,0)		1D	98,91	4,95brs	α
5a	152,75	-		2D	24,17	1,63 ^b m / 2,03 ^b m	
6	119,80	7,72s		3D	22,78	1,93 ^b m / 2,14 ^b m	
6a	133,63	-		4D ^d	70,37	3,65 ^b m	
7	178,62	-			70,17	5,08brs	
8	160,82	-		5D ^d	65,46	4,24q (6,4)	
9	110,02	6,36s			65,63	4,24q (6,4)	
10	190,19	-		6D ^d	16,85	1,26d (6,4)	
10a	112,60	-			16,85	1,32d (6,4)	
11	162,92	-		1E	99,54	5,17d (8,6)	β
11-OH	-	13,45s DMSO- <i>d</i> ₆ ^c		2E	31,28	1,83 ^b m / 2,56m	
11a	124,88	-		3E	30,52	1,81 ^b m / 2,48m	
12	188,90	-		4E	79,23	3,36m	
12a	85,87	-		5E	75,03	3,62 ^b m	
13	56,34	3,74s		6E	18,15	1,39d (6,0)	
14	202,44	-		1F	102,96	4,64dd (8,7; 1,8)	β
15	28,50	2,71s		2F	31,69	1,68 ^b m / 2,14 ^b m	
1A	102,13	5,01 ^b m	n.d.	3F	31,29	1,86 ^b m / 2,13 ^b m	
2A	30,45	1,73 ^b m / 2,24 ^b m		4F	70,67	3,44m	
3A	29,48	1,58 ^b m / 2,22 ^b m		5F	76,34	3,51 ^b m	
4A	78,59	3,27 ^b m		6F	18,43	1,47d (5,8)	
5A	74,51	3,27 ^b m		1' ^d	170,56	-	
6A	17,91	1,00d (4,9)			170,68	-	
1B	98,92	4,99brs	α	2' ^d	46,74	3,91q (7,2) oder 3,92q (7,2)	
2B	24,80	1,53 ^b m / 2,15 ^b m		3' ^d	46,93		
3B	24,52	1,89 ^b m / 1,97 ^b m			13,86	1,67d (7,3) oder 1,66d (7,2)	
4B	74,50	3,51 ^b m		4' ^d	13,86		
5B	66,64	4,00q (6,4)			172,42	-	
6B	16,97	1,21d (6,4)			172,48	-	
				4'-OH	-	n.d.	

¹H und ¹³C-Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung erfolgte nicht gemäß IUPAC; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; ^c in DMSO-*d*₆ gemessene Signale; ^d NMR Zweiersets; n.d. nicht identifizierbare Signale; KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker;
Multiplizitäten: m Multipllett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett;
* austauschbare Signale.

Tab.14 ^1H und ^{13}C NMR Daten von Cervimycin C (3), gemessen in Pyridin- d_5 .

Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	194,93*	-		4B	74,94	3,47 ^b m	
2	101,04	-		5B	67,11	3,99q (6,6)	
3	192,03*	-		6B	17,45	1,21d (6,6)	
3-OH	-	17,98brs CDCl ₃ ^c		1C	99,64	4,98s	α
4	74,14	4,68 ^b m 4,31d (11,8) CDCl ₃ ^c		2C	25,18	1,69 ^b m / 1,95 ^b m	
4a	43,46	3,52 ^b m		3C	24,85	1,86 ^b m / 2,09 ^b m	
5	28,61	3,93wd (18,3) / 4,33dd (18,3; 5,3)		4C	75,06	3,46 ^b m	
5a	153,30	-		5C	67,31	4,04q (6,5)	
6	120,27	7,70s		6C	17,45	1,16d (6,5)	
6a	134,03	-		1D	99,31	4,89s	α
7	179,11	-		2D	24,65	1,59 ^b m / 2,01 ^b m	
8	161,29	-		3D	23,23	1,90 ^b m / 2,09 ^b m	
9	110,50	6,34s		4D	70,53	5,00 ^b m	
10	190,67	-		5D	66,07	4,21q (6,6)	
10a	113,01	-		6D	17,34	1,25d (6,5)	
11	163,34	-		1E	100,10	5,15d (8,6)	β
11-OH	-	13,35s CDCl ₃ ^c		2E	31,78	1,83 ^b m / 2,49 ^b m	
11a	125,65	-		3E	30,93	1,79 ^b m / 2,45 ^b m	
12	189,21	-		4E	79,73	3,33m	
12a	86,22	-		5E	75,51	3,68qd (9,1; 5,9)	
13	56,82	3,74s		6E	18,66	1,41d (6,0)	
14	174,74	-		1F	103,46	4,65 ^b m 4,42dd (9,4; 1,8)	β
14-NH ₂	-	10,23s; 10,48s				CDCl ₃ ^c	
1A	102,69	5,01 ^b m 4,62d (9,1) CDCl ₃ ^c	β	2F	32,18	1,65 ^b m / 2,10 ^b m	
2A	30,93	1,69 ^b m / 2,21 ^b m		3F	31,78	1,85 ^b m / 2,10 ^b m	
3A	29,86	1,54 ^b m / 2,20m		4F	71,18	3,42m	
4A	79,12	3,24 ^b m		5F	76,82	3,52 ^b m	
5A	74,93	3,24 ^b m		6F	18,92	1,47d (5,9)	
6A	18,39	0,96d (5,4)		1'	173,45	-	
1B	99,37	4,95s	α	2'	50,71	-	
2B	25,30	1,52 ^b m / 2,10 ^b m		3'	23,44	1,72s	
3B	24,99	1,86 ^b m / 2,19 ^b m		4'	23,37	1,74s	
				5'	175,54	-	
				5'-OH	-	12,71brs DMSO- d_6 ^c	

¹H und ¹³C-Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung nicht gemäß IUPAC-Regeln; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; ^c in CDCl₃ und DMSO- d_6 gemessene Signale; KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker; Multiplizitäten: m Multipllett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett; * austauschbare Signale.

Tab.15 ^1H und ^{13}C NMR Daten von Cervimycin D (4), gemessen in Pyridin- d_5 .

Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	194,97*	-		1C	99,66	5,00brs	α
2	101,05	-		2C	25,20	1,72 ^b m / 1,99 ^b m	
3	192,07*	-		3C	24,86	1,84 ^b m / 2,22 ^b m	
3-OH	-	18,03brs CDCl ₃ ^c		4C	75,17	3,52 ^b m	
4	74,15	4,67 ^b m		5C	67,33	4,06q (6,4)	
4a	43,47	3,53 ^b m		6C	17,46	1,17dd (6,2)	
5	28,63	3,94wd (18,3) / 4,33dd (18,3; 5,1)		1D	99,39	4,95brs	α
5a	153,31	-		2D	24,66	1,62 ^b m / 2,03 ^b m	
6	120,28	7,71s		3D	23,37	1,93 ^b m / 2,14 ^b m	
6a	134,05	-		4D ^d	70,66	3,62brs	
7	179,12	-			70,87	5,07brs	
8	161,30	-		5D ^d	65,95	4,23q (6,4)	
9	110,51	6,36s			66,12	4,23q (6,4)	
10	190,68	-		6D ^d	17,34	1,25d (6,5)	
10a	113,02	-			17,34	1,31d (6,6)	
11	163,35	-		1E	100,11	5,17m (8,7)	β
11-OH	-	n.d.		2E	31,78	1,86 ^b m / 2,54 ^b m	
11a	125,66	-		3E	31,00	1,84 ^b m / 2,50 ^b m	
12	189,22	-		4E	79,74	3,38m	
12a	86,24	-		5E	75,52	3,69qd (9,0; 6,1)	
13	56,82	3,74s		6E	18,67	1,41d (6,1)	
14	174,76	-		1F	103,47	4,65 ^b m	β
14-NH ₂	-	10,44s; 10,50s		2F	32,19	1,69 ^b m / 2,16 ^b m	
1A	102,70	5,03d (9,8)	β	3F	31,78	1,89 ^b m / 2,13 ^b m	
2A	31,00	1,75 ^b m / 2,25 ^b m		4F	71,19	3,43m	
3A	29,86	1,58 ^b m / 2,22 ^b m		5F	76,84	3,52 ^b m	
4A	79,13	3,27 ^b m		6F	18,92	1,48d (6,0)	
5A	74,96	3,27 ^b m		1' ^d	171,07	-	
6A	18,40	1,00d (5,3)			171,16	-	
1B	99,39	4,98brs	α	2' ^d	47,23	3,90q (7,3) oder 3,89q (7,3)	
2B	25,31	1,51 ^b m / 2,15 ^b m		3' ^d	47,41		
3B	25,01	1,89 ^b m / 1,99 ^b m			14,35	1,67d (7,3) oder 1,65d (7,2)	
4B	74,96	3,52 ^b m		4' ^d	14,35		
5B	67,12	3,99q (6,6)			172,90	-	
6B	17,46	1,21d (6,4)			172,95	-	
				4'-OH	-	n.d.	

¹H und ¹³C-Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung erfolgte nicht gemäß IUPAC; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; ^c in CDCl₃ gemessene Signale; ^d NMR Zweiersets; n.d. nicht identifizierbare Signale; KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker;

Multiplizitäten: m Multipllett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett;

* austauschbare Signale.

Tab.16 ^1H und ^{13}C NMR Daten von Cervimycin E (5) und Cervimycin F (6), gemessen in DMSO- d_6 .

Cervimycin E			Cervimycin F		
Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)
1	-	n.d.	1	195,54*	-
2	110,81	-	2	97,88	-
3	-	n.d.	3	193,85*	-
3-OH	-	n.d.	3-OH	-	18,16brs
4	68,19	3,95m	4	68,11	3,85m
4-OH	-	5,87brs	4-OH	-	5,89brs
4a	44,39	2,61ddd (11,4; 4,8; 1,5)	4a	44,94	2,63ddd (11,9; 5,0; 1,6)
5	27,06	3,37 ^b m / 3,37 ^b m	5	27,00	3,34wdd (18,6; 1,6) / 3,40dd (18,6; 5,0)
5a	150,29	-	5a	150,43	-
6	118,58	7,47s	6	118,56	7,46s
6a	133,82	-	6a	133,71	-
7	178,48	-	7	178,49	-
8	160,85	-	8	160,85	-
9	110,05	6,37s	9	110,04	6,36s
10	190,14	-	10	190,17	-
10a	112,91	-	10a	112,78	-
11	161,81	-	11	161,69	-
11-OH	-	13,37s	11-OH	-	13,35s
11a	124,24	-	11a	124,24	-
12	-	n.d.	12	192,46	-
12a	78,85	-	12a	77,98	-
12a-OH	-	6,77brs	12a-OH	-	6,85brs
13	56,96	3,89s	13	56,96	3,89s
14	202,80	-	14	173,14	-
15	27,90	2,54s			

¹H und ¹³C-Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung nicht gemäß IUPAC-Regeln; n.d. nicht identifizierbare Signale;

Multiplizitäten: m Multipllett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett;

* austauschbare Signale.

Tab.17 ^1H und ^{13}C NMR Daten von Cervimycin G (7) in $\text{DMSO-}d_6$ und Cervimycin M (13) in CDCl_3 .

Cervimycin G				Cervimycin M			
Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	194,12*	-		1	195,67	-	
2	98,08	-		2	110,40	-	
3	192,28*	-		3	191,75	-	
3-OH	-	18,00brs		3-OH	-	18,12brs	
4	72,95	4,13m		4	71,74	4,43d (11,7)	
4a	43,50	2,67dd (11,9; 4,4)		4a	43,51	2,72 ^b m	
5	27,10	3,32 ^b m / 3,40 ^b m		5	27,44	3,54 ^b m / 3,54 ^b m	
5a	151,20	-		5a	151,49	-	
6	119,21	7,36s		6	120,20	7,49s	
6a	133,34	-		6a	133,85	-	
7	178,52	-		7	178,93	-	
8	160,61	-		8	160,46	-	
9	110,30	6,38s		9	110,40	6,38s	
10	189,97	-		10	189,51	-	
10a	112,50	-		10a	113,28	-	
11	161,76	-		11	161,31	-	
11-OH	-	13,37s		11-OH	-	13,46s	
11a	124,02	-		11a	125,04	-	
12	191,50	-		12	191,46	-	
12a	77,83	-		12a	77,95	-	
12a-OH	-	6,90brs		12a-OH	-	4,80brs	
13	56,98	3,98s		13	56,79	3,91s	
14	172,94	-		14	203,29	-	
14-NH ₂	-	9,14brs; 9,39s		15	27,76	2,69s	
1A	101,94	4,59d (8,3)	β	1A	102,24	4,70dd (9,4; 1,5)	β
2A	30,13	1,39m / 1,89 ^b m		2A	30,29	1,55m / 2,01m	
3A	30,74	1,28m / 1,84 ^b m		3A	30,97	1,43m / 2,07m	
4A	75,29	2,89 ^b m		4A	71,36	3,21m	
5A	69,96	2,89 ^b m		5A	75,85	2,98qd (8,8; 6,1)	
6A	17,67	0,65d (5,0)		6A	17,77	0,82d (6,1)	

¹H und ¹³C-Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung nicht gemäß IUPAC-Regeln; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; n.d. nicht identifizierbare Signale;

KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker;

Multiplizitäten: m Multiplett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett);

q Quartett;

* austauschbare Signale.

Tab.18 ^1H und ^{13}C NMR Daten von Cervimycin H (8) gemessen in Pyridin- d_5 .

Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	194,98*	-	13	56,76	3,70s	
2	101,09	-	14	174,74	-	
3	192,02*	-	14-NH ₂	-	10,24s; 10,50s	
3-OH	-	18,08brs CDCl ₃ ^c	1A	103,05	5,04d (8,9)	β
4	74,27	4,70d (11,9)	2A	31,30	1,81 ^b m / 2,26 ^b m	
4a	43,47	3,53 ^b m	3A	30,97	1,81 ^b m / 2,48 ^b m	
5	28,62	4,32dd (18,4; 4,9) / 3,98wd (18,3)	4A	71,17	3,44 ^b m	
5a	153,33	-	5A	76,81	3,29qd (8,8; 6,2)	
6	120,23	7,70s	6A	18,60	1,18d (6,2)	
6a	134,05	-	1E	100,08	5,16d (7,2)	β
7	179,08	-	2E	31,76	1,85 ^b m / 2,56m	
8	161,28	-	3E	31,75	n.d. / n.d.	
9	110,44	6,32s	4E	79,73	3,36 ^b m	
10	190,69	-	5E	75,49	3,68qd (9,0; 6,0)	
10a	112,99	-	6E	18,64	1,40d (6,0)	
11	163,31	-	1F	103,45	4,65d (7,1)	β
11-OH	-	13,39brs CDCl ₃ ^c	2F	32,15	1,68m / 2,14 ^b m	
11a	125,66	-	3F	32,02	1,87 ^b m / 2,13 ^b m	
12	189,35	-	4F	71,17	3,47 ^b m	
12a	86,27	-	5F	76,85	3,53 ^b m	
			6F	18,90	1,47d (6,0)	

^1H und ^{13}C -Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung nicht gemäß IUPAC-Regeln; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; ^c in CDCl₃ gemessene Signale; n.d. nicht identifizierbare Signale; KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker; Multiplizitäten: m Multiplett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett; * austauschbare Signale.

Tab.19 ^1H und ^{13}C NMR Daten von Cervimycin I (9), gemessen in Pyridin- d_5 .

Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	194,92*	-	1A	102,75	5,04dd (9,1; 1,4)	β
2	101,17	-	2A	31,00	1,77m / 2,27 ^b m	
3	192,00*	-	3A	29,94	1,62 ^b m / 2,27 ^b m	
3-OH	-	18,11brs CDCl ₃ ^c	4A	79,12	3,24 ^b m	
4	74,20	4,68 ^b m	5A	75,03	3,27 ^b m	
4a	43,48	3,53 ^b m	6A	18,41	0,96d (5,1)	
5	28,65	4,33dd (18,3; 4,7) / 3,95wd (18.3)	1B	99,62	4,95d (1,8)	α
5a	153,34	-	2B	24,58	1,47m / 2,28 ^b m	
6	120,30	7,71s	3B	26,76	1,83 ^b m / 2,04m	
6a	134,06	-	4B	66,83	3,71 ^b m	
7	179,14	-	5B	67,63	4,06q (6,6)	
8	161,31	-	6B	17,80	1,38d (6,6)	
9	110,51	6,34s	1E	100,11	5,16d (8,8)	β
10	190,69	-	2E	31,79	1,85 ^b m / 2,56m	
10a	113,04	-	3E	31,00	1,86 ^b m / 2,49m	
11	163,37	-	4E	79,76	3,38m	
11-OH	-	13,22brs CDCl ₃ ^c	5E	75,53	3,68qd (9,1; 6,2)	
11a	125,68	-	6E	18,68	1,41d (6,2)	
12	189,29	-	1F	103,48	4,66 ^b m	β
12a	86,27	-	2F	32,19	1,69m / 2,14m	
13	56,82	3,73s	3F	31,79	1,89 ^b m / n.d.	
14	174,73	-	4F	71,20	3,43m	
14-NH ₂	-	10,25s; 10,45s	5F	76,84	3,53 ^b m	
			6F	18,93	1,48d (5,9)	

¹H und ¹³C-Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung nicht gemäß IUPAC-Regeln; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; ^c in CDCl₃ gemessene Signale; n.d. nicht identifizierbare Signale; KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker; Multiplizitäten: m Multipllett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett;
* austauschbare Signale.

Tab.20 ^1H und ^{13}C NMR Daten von Cervimycin J (10), gemessen in CDCl_3 .

Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	194,94	-		4A	78,70	3,11m	
2	110,43	-		5A	74,67	3,00 ^b m	
3	192,60	-		6A	17,96	0,69d (5,5)	
3-OH	-	17,99brs		1B	99,15	4,80brs	α
4	70,52	3,64 ^b m		2B	24,78	1,43 ^b m / 1,44 ^b m	
4a	43,80	2,75dd (11,6; 3,8)		3B	24,62	1,70 ^b m / 1,87m	
5	27,32	3,50 ^b m / 4,33m		4B	74,56	3,49brs	
5a	151,64	-		5B	66,73	3,85q (6,4)	
6	120,31	7,53s		6B	17,18	1,08d (6,4)	
6a	133,78	-		1C	99,35	4,80brs	α
7	178,99	-		2C	24,62	1,91 ^b m / 2,07 ^b m	
8	160,33	-		3C	24,43	1,73 ^b m / 2,04 ^b m	
9	110,43	6,11s		4C	74,90	3,43brs	
10	189,32	-		5C	66,92	3,95q (6,4)	
10a	113,18	-		6C	17,12	1,08d (6,4)	
11	163,25	-		1D	99,11	4,86brs	α
11-OH	-	13,37s DMSO- <i>d</i> ₆ ^c		2D	24,17	1,79 ^b m / n.d.	
11a	124,03	-		3D	22,85	1,76 ^b m / 2,11 ^b m	
12	191,84	-		4D	70,72	4,80 ^b s	
12a	77,20	-		5D	65,70	4,10q (6,4)	
12a-OH	-	6,87s DMSO- <i>d</i> ₆ ^c		6D	16,93	1,08d (6,4)	
13	56,73	3,90s		1'	172,64	-	
14	173,29	-		2'	49,86	-	
14-NH ₂	-	9,38s DMSO- <i>d</i> ₆ ^c		3'	22,85	1,47s	
1A	102,16	4,63d (7,8)	β	4'	22,96	1,49s	
2A	29,30	1,48 ^b m / 1,99 ^b m		5'	175,83	-	
3A	30,21	1,54 ^b m / 2,11 ^b m		5'-OH	-	12,83brs DMSO- <i>d</i> ₆ ^c	

¹H und ¹³C-Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung nicht gemäß IUPAC-Regeln; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; ^c in DMSO-*d*₆ gemessene Signale; n.d. nicht identifizierbare Signale; KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker; Multiplizitäten: m Multiplett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett.

Tab.21 ^1H und ^{13}C NMR Daten von Cervimycin K (11), gemessen in CDCl_3 .

Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	193,92	-		1B	99,39	4,78brs	α
2	101,04	-		2B	24,79	1,40 ^b m / 1,43 ^b m	
3	190,36	-		3B	24,65	1,65 ^b m / 1,85 ^b m	
3-OH	-	18,10s		4B	74,40	3,42brs	
4	72,18	4,32d (11,9)		5B	66,75	3,88 ^b m	
4a	43,02	3,08 ^b m		6B	17,19	1,09d (6,4)	
5	27,81	3,50wd (17,8) / 3,83 ^b m		1C	99,58	4,80brs	α
5a	152,81	-		2C	24,65	1,96 ^b m / 2,05 ^b m	
6	120,36	7,52s		3C	24,44	1,73 ^b m / 2,05 ^b m	
6a	133,53	-		4C	75,13	3,46brs	
7	179,11	-		5C	66,94	3,93q (6,4)	
8	160,29	-		6C	17,14	1,09d (6,4)	
9	110,46	6,11s		1D	99,10	4,80brs	α
10	189,60	-		2D	22,66	165 ^b m / 1,90 ^b m	
10a	112,74	-		3D	23,60	173 ^b m / 2,05 ^b m	
11	163,16	-		4D	67,50	3,57brs	
11-OH	-	13,29s		5D	66,75	4,04q (6,4)	
11a	124,85	-		6D	17,09	1,15d (6,6)	
12	189,29	-		1E	99,54	4,55d (9,4)	β
12a	85,36	-		2E	30,20	1,53 ^b m / 2,13 ^b m	
13	56,71	3,90s		3E	30,98	1,54 ^b m / 2,13 ^b m	
14	173,63	-		4E	79,61	3,10 ^b m	
14-NH ₂	-	9,64s; 9,65s		5E	74,93	3,30 ^b m	
1A	102,23	4,63d (9,1; 1,8)	β	6E	18,26	1,20d (6,0)	
2A	29,34	1,48 ^b m / 2,08 ^b m		1F	102,95	4,42dd (9,1; 1,8)	β
3A	30,04	1,54 ^b m / 2,17 ^b m		2F	30,86	1,54 ^b m / 1,81 ^b m	
4A	78,75	3,08 ^b m		3F	31,20	1,41 ^b m / 2,04 ^b m	
5A	74,56	3,03 ^b m		4F	71,34	3,23 ^b m	
6A	17,98	0,70d (5,7)		5F	75,79	3,22 ^b m	
				6F	18,10	1,25 ^b m	

^1H und ^{13}C -Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung nicht gemäß IUPAC-Regeln; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker

Multiplizitäten: m Multiplett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett.

Tab.22 ^1H und ^{13}C NMR Daten von Cervimycin L (12), gemessen in CDCl_3 .

Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	195,71	-		4A	78,65	3,24m	
2	110,49	-		5A	74,79	3,05m	
3	191,84	-		6A	18,01	0,68d (5,9)	
3-OH	-	n.d.		1B	99,16	4,78brs	α
4	71,58	4,42d (11,4)		2B	24,80	1,42 ^b m / 1,43 ^b m	
4a	43,54	2,69 ^b m		3B	24,66	1,65m / 1,83m	
5	27,44	3,51 ^b m / 4,32m		4B	74,55	3,43brs	
5a	151,57	-		5B	66,77	3,86q (6,4)	
6	120,34	7,53s		6B	17,21	1,09d (6,4)	
6a	133,78	-		1C	99,38	4,81brs	α
7	178,94	-		2C	24,65	1,95 ^b m / n.d.	
8	160,41	-		3C	24,45	1,72 ^b m / 2,05m	
9	110,39	6,12s		4C	74,92	3,50 ^b m	
10	189,49	-		5C	66,92	3,94q (6,4)	
10a	113,23	-		6C	17,15	1,09d (6,4)	
11	163,28	-		1D	99,16	4,86brs	α
11-OH	-	13,45s		2D	24,19	n.d. / n.d.	
11a	123,93	-		3D	22,88	1,75 ^b m / 2,11 ^b m	
12	191,47	-		4D	70,88	4,82 ^b s	
12a	77,96	-		5D	65,67	4,11q (6,4)	
12a-OH	-	4,81s		6D	16,94	1,08d (6,4)	
13	56,77	3,91s		1'	172,59	-	
14	203,29	-		2'	49,86	-	
15	27,78	2,69s		3'	22,88	1,48s	
1A	102,17	4,67d (7,2)	β	4'	22,99	1,49s	
2A	29,28	1,46 ^b m / 1,98 ^b m		5'	175,62	-	
3A	30,21	1,55 ^b m / 2,10 ^b m		5'-OH	-	n.d.	

¹H und ¹³C-Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung nicht gemäß IUPAC-Regeln; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; n.d. nicht identifizierbare Signale; KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker; Multiplizitäten: m Multiplett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett.

Tab.23 ^1H und ^{13}C NMR Daten des Cervimycin A-methylesters (14), gemessen in CDCl_3 .

Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	195,89	-		4B	74,53	3,42brs	
2	112,14	-		5B	66,70	3,84q (6,6)	
3	192,27	-		6B	17,19	1,09d (6,6)	
3-OH	-	18,03brs		1C	99,37	4,82brs	α
4	68,89	n.d.		2C	24,62	1,97 ^b m / 2,05 ^b m	
4a	42,36	3,02 ^b m		3C	24,44	1,73 ^b m / 2,06 ^b m	
5	27,83	3,47wd (18,3) / 3,91 ^b m		4C	74,81	3,48brs	
5a	152,81	-		5C	66,89	3,93q (6,6)	
6	120,39	7,53s		6C	17,17	1,09d (6,6)	
6a	133,50	-		1D	99,15	4,83brs	α
7	179,07	-		2D	24,13	169 ^b m / 1,94 ^b m	
8	160,35	-		3D	22,94	175 ^b m / 2,12 ^b m	
9	110,37	6,11s		4D	70,50	4,79 ^b m	
10	189,53	-		5D	65,53	4,08q (6,6)	
10a	112,60	-		6D	16,94	1,06d (6,6)	
11	163,15	-		1E	99,58	4,57 ^b m	n.d.
11-OH	-	13,41s		2E	30,34	1,53 ^b m / 2,12 ^b m	
11a	124,40	-		3E	30,94	1,51 ^b m / 2,12 ^b m	
12	189,92	-		4E	79,54	3,10 ^b m	
12a	85,89	-		5E	75,09	3,28qd (8,8; 6,2)	
13	56,77	3,90s		6E	18,24	1,20d (6,2)	
14	203,38	-		1F	102,96	4,42dd (9,5; 1,8)	β
15	28,10	2,66s		2F	30,85	1,53 ^b m / 1,77 ^b m	
1A	102,13	4,63 ^b m	n.d.	3F	31,18	1,40 ^b m / 1,96 ^b m	
2A	29,30	1,46 ^b m / 2,08 ^b m		4F	71,33	3,23 ^b m	
3A	29,68	1,53 ^b m / 2,17 ^b m		5F	75,77	3,22 ^b m	
4A	78,69	3,09 ^b m		6F	18,10	1,25d (6,0)	
5A	74,52	3,01 ^b m		1'	172,50	-	
6A	17,94	0,66m		2'	50,12	-	
1B	99,15	4,79brs	α	3'	22,80	1,44s	
2B	24,77	1,40 ^b m / 1,44 ^b m		4'	22,88	1,46s	
3B	24,62	1,69 ^b m / 1,85 ^b m		5'	173,29	-	
				6'	52,39	3,70s	

¹H und ¹³C-Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung nicht gemäß IUPAC-Regeln; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; n.d. nicht identifizierbare Signale; KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker; Multiplizitäten: m Multipllett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett.

Tab.24 ^1H und ^{13}C NMR Daten des Cervimycin C-methylesters (15), gemessen in CDCl_3 .

Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁	Pos. ^a	d _C [ppm]	d _H [ppm] (J in Hz)	KC ₁
1	193,91	-		4B	74,69	3,42brs	
2	101,07	-		5B	66,74	3,84q (6,6)	
3	190,36	-		6B	17,21	1,09d (6,6)	
3-OH	-	18,11brs		1C	99,38	4,83brs	α
4	72,18	4,32wd (11,8)		2C	24,66	1,95 ^b m / 2,06 ^b m	
4a	43,04	3,07 ^b m		3C	24,47	1,76 ^b m / 2,08 ^b m	
5	27,85	3,50wd (18,3) / 3,84dd (18,3; 5,1)		4C	74,85	3,50brs	
5a	152,81	-		5C	66,93	3,94q (6,6)	
6	120,37	7,52s		6C	17,15	1,09d (6,6)	
6a	133,54	-		1D	99,17	4,86brs	α
7	179,13	-		2D	24,16	179 ^b m / 1,95 ^b m	
8	160,31	-		3D	22,89	1,81 ^b m / 2,14 ^b m	
9	110,47	6,11s		4D	70,54	4,82 ^b m	
10	189,61	-		5D	65,56	4,08q (6,6)	
10a	112,75	-		6D	16,94	1,06d (6,6)	
11	163,15	-		1E	99,60	4,56 ^b m	n.d.
11-OH	-	13,35s		2E	30,21	1,52 ^b m / 2,12 ^b m	
11a	124,87	-		3E	30,99	1,52 ^b m / 2,13 ^b m	
12	190,38	-		4E	79,61	3,10 ^b m	
12a	85,37	-		5E	75,07	3,26 ^b m	
13	56,71	3,90s		6E	18,27	1,20d (6,0)	
14	173,65	-		1F	102,96	4,42dd (9,1; 1,8)	β
14-NH ₂	-	9,64s; 9,65s		2F	30,88	1,54 ^b m / 1,83 ^b m	
1A	102,24	4,63dd (9,2; 1,8)	β	3F	31,22	1,44 ^b m / 2,01 ^b m	
2A	29,34	1,54 ^b m / 2,05 ^b m		4F	71,37	3,24 ^b m	
3A	30,06	1,52 ^b m / 2,16 ^b m		5F	75,80	3,23 ^b m	
4A	78,76	3,05 ^b m		6F	18,10	1,25d (5,9)	
5A	74,56	3,03 ^b m		1'	172,50	-	
6A	17,99	0,70d (5,7)		2'	50,15	-	
1B	99,17	4,78brs	α	3'	22,81	1,45s	
2B	24,81	1,44 ^b m / 1,44 ^b m		4'	22,89	1,46s	
3B	24,65	1,71 ^b m / 1,91 ^b m		5'	173,29	-	
				6'	52,36	3,70s	

¹H und ¹³C-Spektren (300,13 MHz, 500,13 MHz und 75,47 MHz); ^a Bezifferung nicht gemäß IUPAC-Regeln; ^b Partielle Überlappung verschiedener Resonanzen; n.d. nicht identifizierbare Signale; KC₁ relative Konfiguration im anomeren C₁ der Zucker; Multiplizitäten: m Multipllett; s Singulett (brs breites Singulett); d Dublett (wd weites Dublett); q Quartett.

Tab.25 ^{13}C -Markierung des Cervimycin C

Berechnung von % ^{13}C nach Kap. 5.13.4

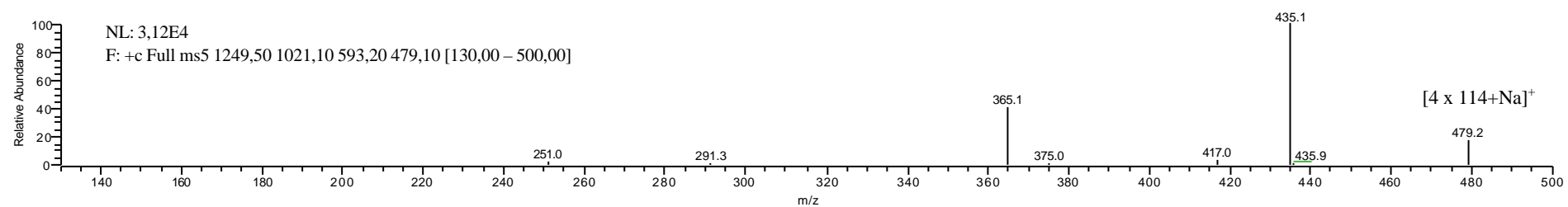
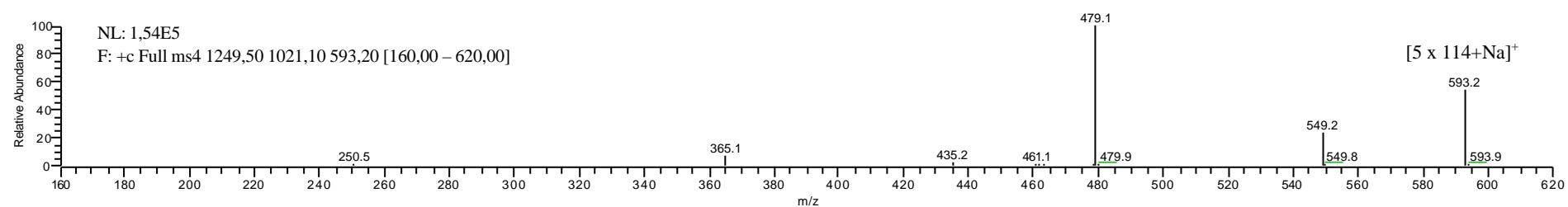
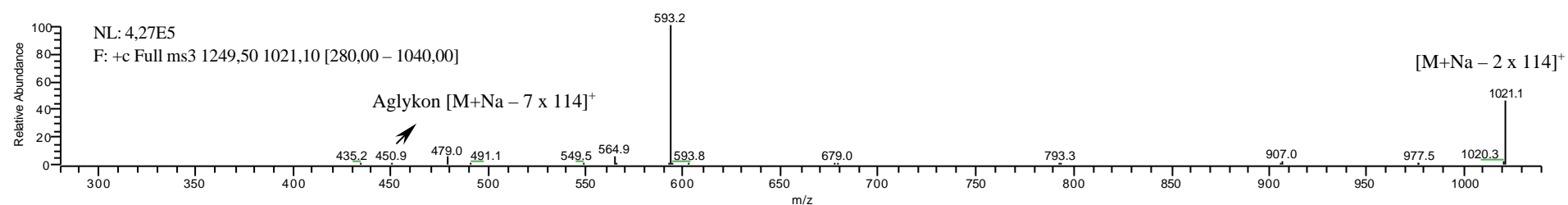
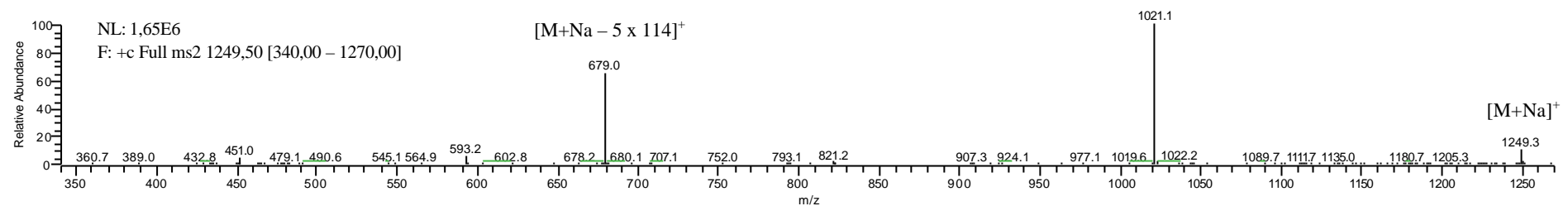
^{13}C -markiertes Cervimycin C (L-Methionin-methyl- ^{13}C)				^{13}C -markiertes Cervimycin C (2- ^{13}C -Malonsäure)				^{13}C -markiertes Cervimycin C (1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ -Malonsäure)				
Pos. ^a	RF	Am [x10 ⁸ abs]	% ^{13}C	Pos. ^a	RF	Am [x10 ⁸ abs]	% ^{13}C	Pos. ^a	RF	Am [x10 ⁸ abs]	% ^{13}C	$^1J_{\text{cc}}$ [Hz]
C1	3,21	0,20	1,01	C1	3,21	1,54	0,75	C1	2,55	32,86	14,88	62,2 (C2)
C2	2,90	0,21	0,96	C2	2,90	18,44	8,16	C2	2,31	25,75	10,57	62,2 (C1); 62,8 (C14)
C3	1,97	0,33	1,02	C3	1,97	2,15	0,65	C3	1,56	47,69	13,22	45
C4	0,95	0,67	1,00	C4	0,95	49,24	7,14	C4	0,75	91,66	12,22	45
C4a	1,00	0,53	0,83	C4a	1,00	6,32	0,96	C4a	0,79	89,47	12,56	35
C5	1,00	0,51	0,80	C5	1,00	43,72	6,67	C5	0,91	90,17	14,58	35
C5a	2,06	0,33	1,07	C5a	2,06	2,46	0,77	C5a	1,64	48,34	14,09	57
C6	1,12	0,55	0,97	C6	1,12	46,94	8,02	C6	0,89	87,89	13,90	57
C6a	2,62	0,27	1,11	C6a	2,62	2,66	1,06	Ca	2,08	36,54	13,51	56
C7	4,29	0,22	1,48	C7	4,29	19,51	12,77	C7	3,41	27,12	16,43	56
C8	3,10	0,28	1,36	C8	3,10	2,22	1,05	C8	2,47	31,50	13,83	71
C9	1,00	0,70	1,10	C9	1,00	51,13	7,80	C9	0,79	91,01	12,78	71
C10	2,33	0,31	1,14	C10	2,33	2,50	0,89	C10	1,85	37,90	12,46	55
C10a	3,34	0,22	1,15	C10a	3,34	21,57	11,00	C10a	2,66	32,30	15,27	55
C11	2,44	0,29	1,11	C11	2,44	2,39	0,89	C11	1,94	40,19	13,86	68
C11a	2,55	0,32	1,28	C11a	2,55	21,86	8,50	C11a	2,03	40,61	14,65	68
C12	2,59	0,24	0,98	C12	2,59	1,95	0,77	C12	2,05	37,04	13,49	45
C12a	3,31	0,20	1,04	C12a	3,31	17,05	8,61	C12a	2,63	33,38	15,60	45
C13	1,26	38,96	77,14	C13	1,26	5,13	0,99	C13	1,00	6,19	1,10	-
C14	1,90	0,38	1,13	C14	1,90	3,23	0,94	C14	1,51	56,30	15,11	62,8 (C2)
C1'	3,09	0,23	1,12	C1'	3,09	2,21	1,04					
C2'	3,55	0,20	1,12	C2'	3,55	1,82	0,99					
C3'	0,90	0,86	1,22	C3'	0,90	8,71	1,11					
C4'	0,78	0,86	1,05	C4'	0,78	8,11	1,04					
C5'	2,82	0,18	0,80	C5'	2,82	1,65	0,71					
C-9 = Referenzkohlenstoff				C-9 = Referenzkohlenstoff				C-13 = Referenzkohlenstoff				

Tab.26 ^{13}C -Markierung des Cervimycin A und Cervimycin D

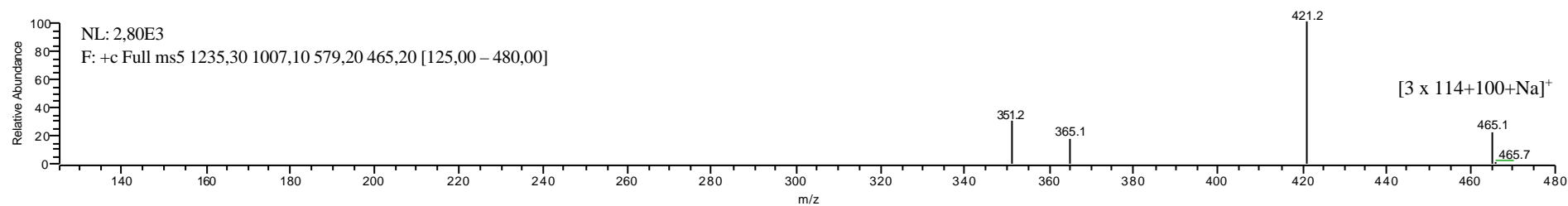
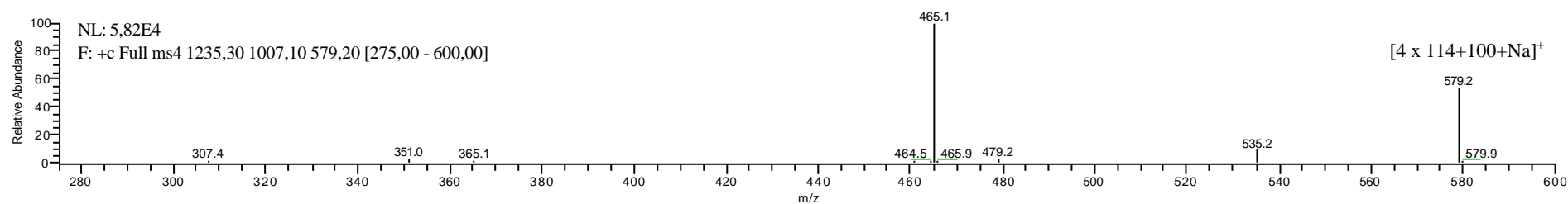
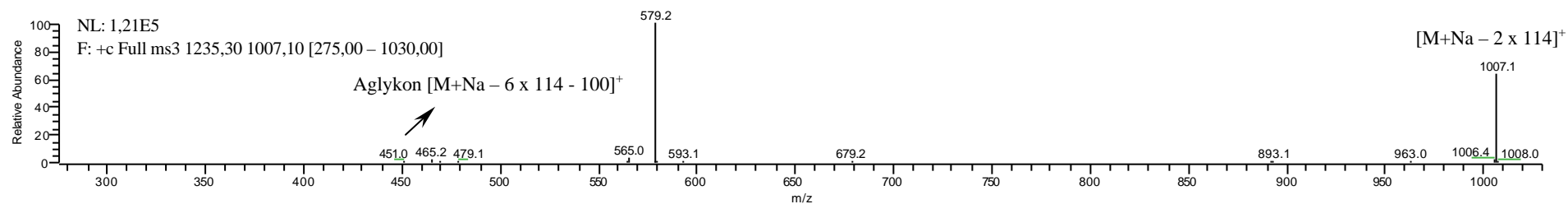
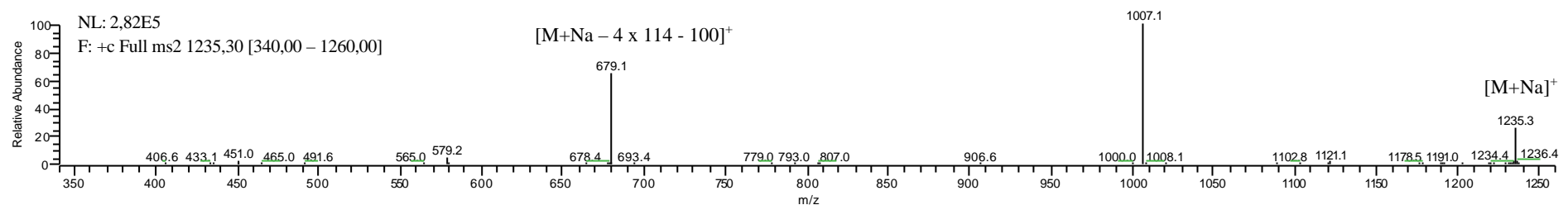
Berechnung von % ^{13}C nach Kap. 5.13.4

^{13}C -markiertes Cervimycin A (2- ^{13}C -Malonsäure)				^{13}C -markiertes Cervimycin D (1,3- $^{13}\text{C}_2$ -Malonsäure)			
Pos. ^a	RF	Am [x10 ⁸ abs]	% ^{13}C	Pos. ^a	RF	Am [x10 ⁸ abs]	% ^{13}C
C1	2,30	0,44	0,62	C1	2,60	5,42	10,84
C2	4,43	6,28	16,90	C2	3,48	0,53	1,42
C3	1,49	0,70	0,63	C3	2,04	6,90	10,83
C4	0,80	10,84	5,27	C4	1,00	1,67	1,28
C4a	0,94	1,10	0,63	C4a	1,08	17,78	14,77
C5	1,02	12,87	7,98	C5	1,23	1,61	1,52
C5a	2,64	0,36	0,58	C5a	2,41	7,77	14,40
C6	0,84	12,08	6,17	C6	0,87	1,52	1,02
C6a	2,46	0,52	0,78	C6a	1,88	5,95	8,60
C7	4,02	3,80	9,28	C7	3,42	0,21	0,55
C8	2,13	0,30	0,46	C8	2,88	4,98	11,03
C9	0,62	16,58	6,25	C9	1,00	1,43	1,10
C10	1,86	0,68	0,77	C10	2,13	5,76	9,44
C10a	3,93	5,35	12,78	C10a	2,35	0,35	0,63
C11	3,05	0,66	1,22	C11	2,42	5,90	10,98
C11a	2,01	4,83	5,90	C11a	3,48	0,20	0,54
C12	2,46	0,38	0,57	C12	2,78	4,56	9,75
C12a	3,93	5,66	13,52	C12a	3,39	0,18	0,47
C13	1,00	1,81	1,10	C13	1,20	4,20	3,88
C14	1,88	0,73	0,83	C14	1,57	8,39	10,13
C15	0,97	13,04	7,69	C1'	3,10	0,36	0,86
C1'	2,27	0,55	0,76	C2'	1,17	0,91	0,82
C2'	4,32	0,45	1,18	C3'	1,06	1,23	1,00
C3'	0,71	2,65	1,14	C4'	4,22	0,15	0,49
C4'	0,66	2,47	0,99				
C5'	7,34	0,47	2,11				
C-13 = Referenzkohlenstoff				C-9 = Referenzkohlenstoff			

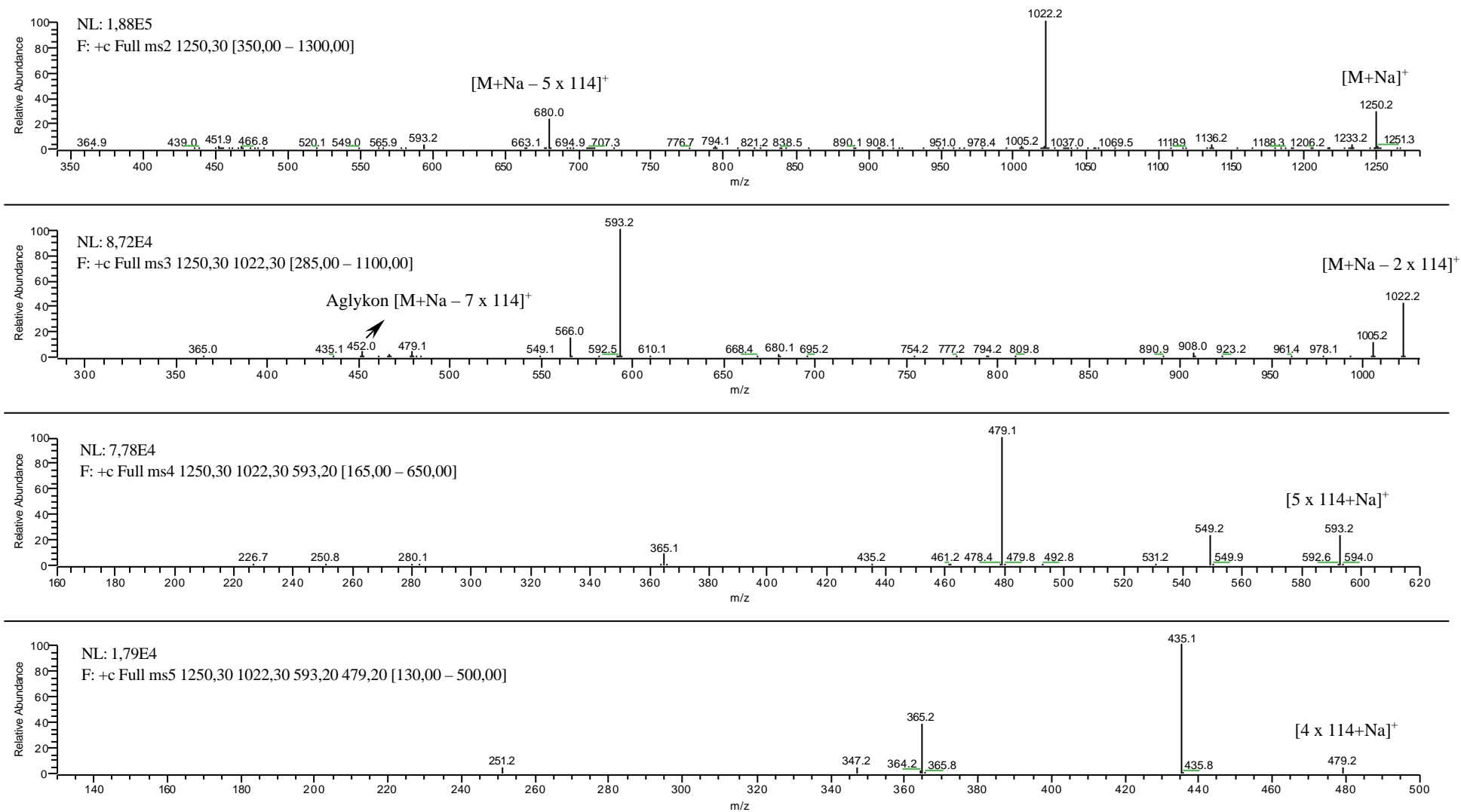
MSⁿ-Spektrum des Cervimycin A (siehe Kap. 3.5.1.2)



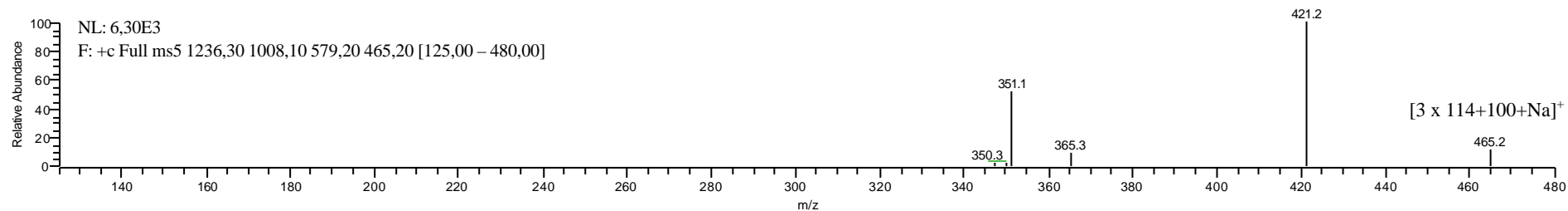
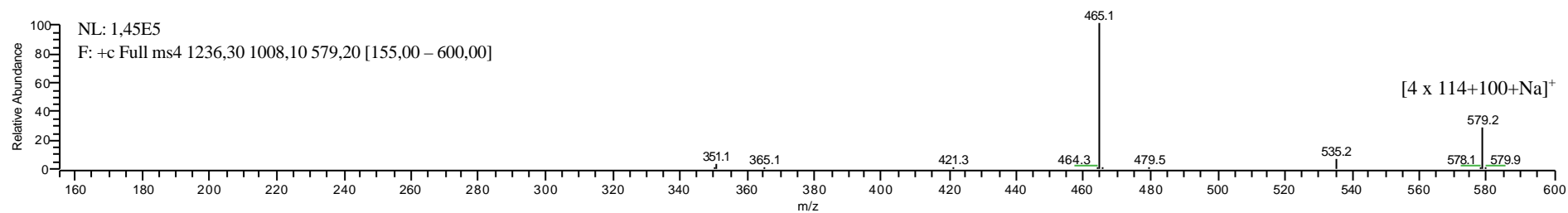
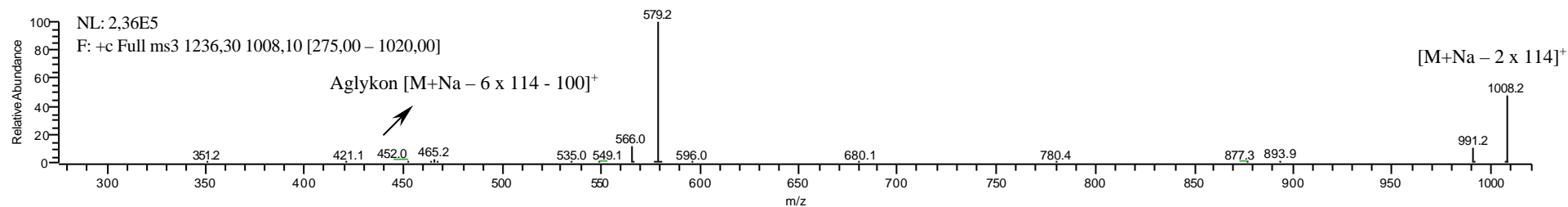
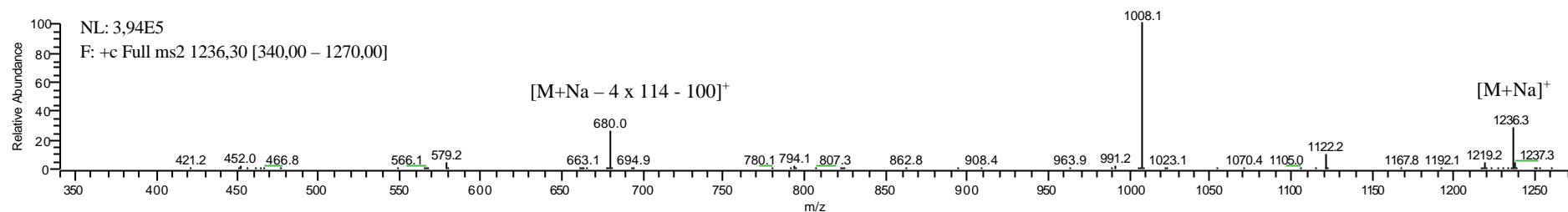
MSⁿ-Spektrum des Cervimycin B (siehe Kap. 3.5.1.3)



MSⁿ-Spektrum des Cervimycin C (siehe Kap. 3.5.1.2)

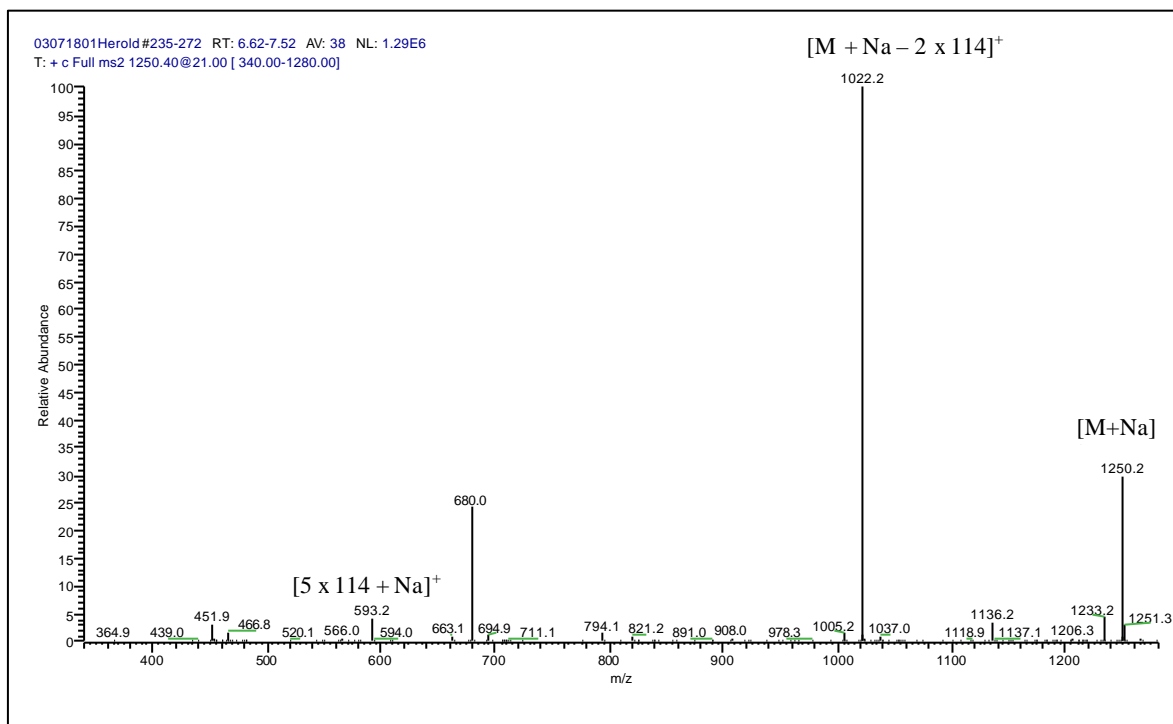


MSⁿ-Spektrum des Cervimycin D (siehe Kap. 3.5.1.3)

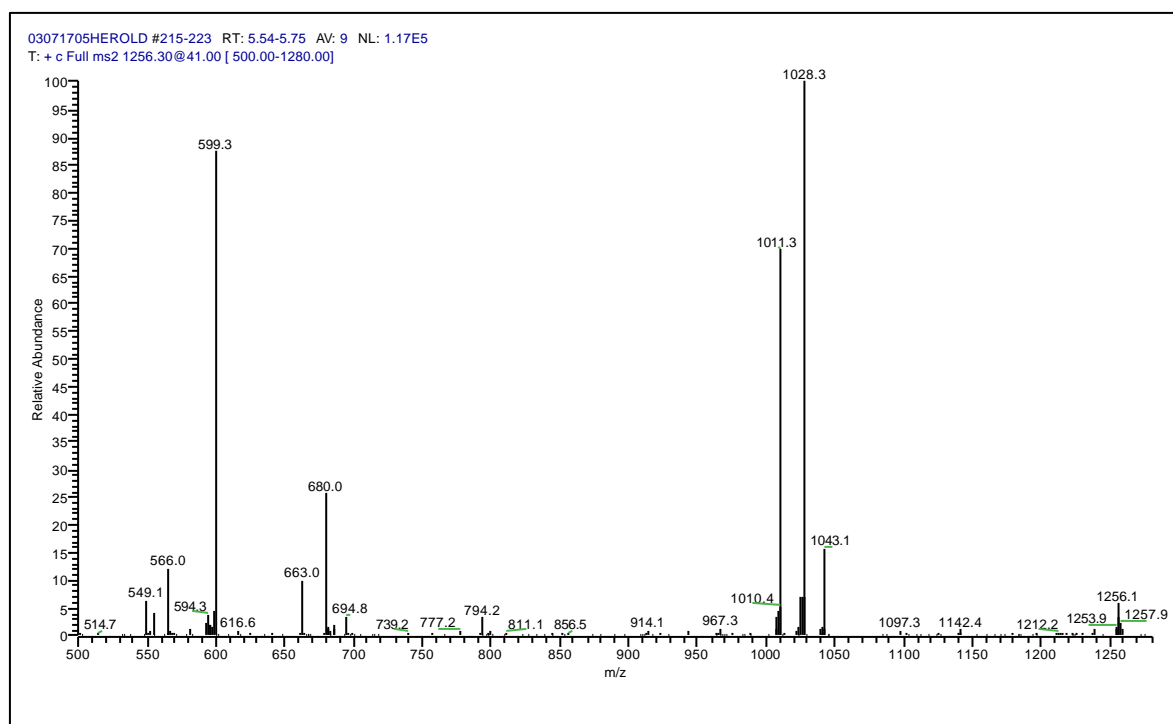


**Ms²-Spektren des Cervimycin C (a; Vergleich) und des d₆-markierten Cervimycin C (b)
zum Nachweis des L-Valineinbaus (siehe Kap. 3.9.2)**

a)



b)



Nukleotid- und korrespondierende Proteinsequenzen der Gene der Cervimycin-PKS

(siehe Kap. 3.9.2.3)

Consensus2.sequenz :

KS_a

Nukleotidsequenz - *cerA*:

Base 230 bis 1171

Größe: 942 bp

```
ATGACGATCAGCCTGGACCGCGAGTACGCCGTCGTCAGTGACAACGGCAG
GAAATGGCACGTCGACGAGGCGCACGGCTCGCCCTACCTCTACGACTACT
TCGCGCCCTCGTCCATGGCCGCCGAACTCGCCTGGCTGGCGGAGGCGCAA
GGGCCCCGTCGGCGTCATCTCGACGGGCTGCACCTCCGGCATCGACGTGCT
CGGCCACGCCGCCGACCTCATCATCGACGGGGCGGCGGACGTCATGATCA
GCGGCGCCTCCGACGCCGCCATCTCGCCGATCACCGTGGCGTGCTTCGAC
GCGATCCGGGCGACCACACCGCGCAACGACGATCCGGCGACCGCGTCCCCG
CCCCTTCGACAGGACACGCAACGGGTTCGCGCTCGGCGAGGGTTCCGCGA
TCCTCGTCCTGGAGGAGTACGGGCACGCCCCGCCGCCGCGGCGCCCGGGTC
TACGCCGAGGTCGCGGGCCACGCGACCCGCGCGAACGCCTTCAGCATGAC
CGGACTGCGCCCCGGACGGCAGGGAACCTGGCCGAGGCCATCACCGTGGCCC
TCGACCGTGCCGAGGCGAACCCGTCCGACATCGGATACATCAACGCGCAC
GGCTCGTCGACCAAGCAGAACGACCTGCACGAGACGATGGCGTACAAGCG
CAGCCTCGGCGAGCACGCCTACCGGGCCCCCATCAGTTCGATCAAGTCGA
TGATCGGGCACTCCCTGGGAGCGATCTGCGCGCTGGAGGTGGCCGCCTCC
GTACTCGCCATCGAACACTCGGTGATTCCGCCGACGGCCAACCTGCACGA
GCCCCGATCCCGCGTGCGACCTCGACTACGTGCCGTTGGTGGCCCCGCGAAC
AGCCGTCCGACGTGGTGCTCAGCGTGGCCAGCGGATTTCGGCGGCTTCCAG
AGCGCGATGGTGCTGACCGCACCGGATTGGACCGCACCATGA.
```

Proteinsequenz - CerA:

Basencode von 230 bis 1168

Größe: 313 Aminosäuren

```
MTISLDREYAVVSDNGRKWHVDEAHGSPYLYDYFAPSSMAAELAWLAEAQ
GPVGVISTGCTSGIDVLGHAADLIIDGAADVMSIGASDAISPITVACFD
AIRATTTPRNDDPATASRPFDRTNRNGFALGEGSAILVLEEYGHARRRGARV
YAEVAGHATRANAFSMTGLRPDGRELAEAITVALDRAEANPSDIGYINAH
GSSTKQNDLHETMAYKRSLGEHAYRAPISSIKSMIGHSLGAICALEVAAS
VLAIEHSVIPPTANLHEPDACDLDYVPLVAREQPSDVVLSVASGFGGFQ
SAMVLTAPDWTAP.
```

KS_b

Nukleotidsequenz - *cerB*:

Base 1168 bis 2385

Größe: 1218 bp

ATGAGCGCGCCCGTGATCACCGGACTGGGCACGGTCTCCCCGAACGGGCT
GGGCACGGAGGCCTACTGGTCGGCGACCCTGCGCGGCGAGAGCGGCATCG
GTCCGATCACCCGGTTCGAGCCGGACGGGTACCGCGGCCGAACGGGCGGC
GAGGTCAAGGACTTCGAGCCGAAGGAGCACCTGCCGAGCAGGCTTCTGCC
GCAGACGGACCACATGACCCGCCTCGCGCTGGTCGCCGCCGAGGAGGCGC
TGTCCGACGCGGGCATCGACCCCGACGCACTCCCGGACTTCGCGATGGGC
GTGGTGACCGCGGCGTCCGCGGGCGGGATGGAGTTCGGGCAGCGGGAGAT
GGAGGCGCTCTGGAGCAAGGGCGGCGCCTACGTGAGCTCGTATCAGGCGT
TCGCCTGGTTCTACCCGGTCAACACCGGCCAGATCTCCATCCGGCACGGC
CTGCGCGGTGCGAGCTCGGCCGTCGTCACCGAACAGGCCGGCGGACTCGA
CGCCGTCGCCAAGGCCCGGGCGGCACATCCGCCAGGGCACCCCGCAGATGC
TCGCCGGCGGCGTTCGACAGCGCTCTGTGCCCTGGGGCTGGCTGTGCATG
TCCCGCTCCGGGCGGGTGTCCACGGTGGAGGACCCGGCCCGGGCGTATGT
GCCCTTCGACACCGGGGCGCTCGGGCTATGTGCCGGGGGAGGGCGGGCGCAC
TGCTGGTCATGGAGGACGGGGCGGCGGCCGCCCGGCGCGGCGCGGACAAG
CCGTACGGAGCCGTGGCGGGCTACGCGTCGACGTTTCGACCCGCGGCCCGG
CAGCGATCAGGAGCCCGGCCTGAGGCGGGCCCTGGAGATGGCCCTGGCCC
AGGCGCGGATCACGCCCGCCGACATCGACCTCGTGTATGCCGACGCCTGC
GGCGTGCCCGAACTGGACCTGGTGGAGGCCGAGACGCTGGCCCGGGTGTT
CGGGCCCCGGGGCGTGCCCGTGACCGCTCCCAAGACGATGACGGGACGGC
TGCTCGCCGGAGGCGCCTCGCTCGACCTCGCGGCGGCCCTGCTGTCCCTG
CGCGACCAGGTCGTCCCGCCACGGTGAACATCGACCGGCCGGCTCACGG
CCGGCTCATCGACCTGGTCGTGGGTGAGCCGCGCGAGGCCCGGCTCACCC
ACGCCCTGGTCCTCGCGCGCGGCTATGGCGGATTCAACTCCGCCATGGTC
GTCAGGCGCGAGGCCTGA.

Proteinsequenz - CerB:

Basencode von 1168 bis 2382

Größe: 405 Aminosäuren

MSAPVITGLGTVSPNGLGTEAYWSATLRGESGIGPITRFEPDGYRGRTGG
EVKDFEPKEHLP SRLLPQTDH MTRLALVAAEEALSDAGIDPDALPDFAMG
VVTAASAGGMEFGQREMEALWSKGGAYVSSYQAFWFYPVNTGQISIRHG
LRGASSAVVTEQAGGLDAVAKARRHIRQGTPQMLAGGVDSALCPWGWLCM
SRSGRVSTVEDPARAYVPFDTGASGYVPGE GALLVMEDGAAAARRGADK
PYGAVAGYASTFDPRPGSDQEPGLRRALEMALAQARITPADIDL VYADAC
GVPELDLVEAETLARVFGPRGVPVTAPKTM TGRLLAGGASLDLAAALLSL
RDQVVPPTVNIDRPAHGRLIDL VVGEPREARLTHALVLARGYGGFNSAMVVRREA.

ACP

Nukleotidsequenz - *cerC*:

Base 2447 bis 2722

Größe: 276 bp

ATGAGAGGAACACCGACCATGGCCGCCTTCGGCGTCAAGGAACTCGTGGA
CGTCCTGCGCGAGAGTGCTGGTGAGGACGAGGACGTCAGCCTCGAAGGGG
ACATCCTCGATGTCGACTTCGAGTCGCTCGGCTACGACTCGCTCGCCCTG
TTCAACACGGTGCGGTGGATCGAGCGTGATCTCGGCATCACCTGTCCGA
CGAGGCCATCGACGTCGAGGGAACGCCGCGTGCCCTCCTGGACGAGATCA
CCAAGGCGGCCACCCAGTCGGTCTGA.

Proteinsequenz - CerC:

Basencode von 2447 bis 2719

Größe: 91 Aminosäuren

MRGTPTMAAFGVKELVDVLRESAGEDEDVSLEGDILDVDFESLGYDSLAL
FNTVRWIERDLGITLSDEAIDVEGTPRALLDEITKAATQSV.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V. Jena unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Udo Gräfe und Herrn Doz. Dr. Bernd Liebermann.

Allen Personen, die durch ihre freundliche Unterstützung und ihr Interesse zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, sei an dieser Stelle herzlich gedankt:

Herr Prof. Dr. U. Gräfe, der mir durch die Vergabe des spannenden Themas die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation gegeben hat. Er hat mich bis zu seinem Tod im Februar 2003 engagiert betreut und in konstruktiven Diskussionen wegweisende Impulse gegeben. Durch seine freundliche Art hatte er immer ein offenes Ohr und stand stets für Problemlösungen zur Seite. Mit seiner außerordentlichen Tatkräftigkeit und seinem wissenschaftlichen Ideenreichtum sorgte er für eine inspirierende Atmosphäre und war immer um ein harmonisches Arbeitsklima bestrebt. Er wird mir als guter Mensch und unermüdlicher Wissenschaftler in Erinnerung bleiben.

Herrn Doz. Dr. Bernd Liebermann am Institut für Pharmazeutische Biologie der FSU Jena bin ich dankbar, dass er die Betreuung meiner Arbeit ab März 2003 übernommen hat. Er stand mir vor allem bei Problemlösungen der Biosyntheseuntersuchungen zur Seite und hat mich in der Testauswertung tatkräftig unterstützt.

Herrn Dr. C. Hertweck danke ich ganz besonders für seine fachliche Betreuung und seine Ideen zur Umsetzung der molekularbiologischen Arbeiten. Er war ein kompetenter Ansprechpartner in verschiedenen Fragen und hat diese Dissertation kritisch gelesen.

Den Mitarbeitern des Technikums am HKI bin ich zu großem Dank verpflichtet, ohne die die Fermentation und Fermentationsoptimierung nicht möglich gewesen wären. Ganz besonders danke ich in diesem Zusammenhang Herrn Dr. M. Roth für seine konstruktive Zusammenarbeit. Frau K. Perlet und Frau G. Krauter haben mir mit großem Einsatz in der Kultivierung des Stammes und Vorbereitung der Schüttelansätze geholfen.

Ich danke allen Wissenschaftlern und Kollegen, die mit der Durchführung der biologischen Assays einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Mein Dank gebührt Herrn Dr. M. Dahse für die Testung der Zytotoxizität und Antiproliferation, Frau Dr. M. Schmidtke am Institut für Virulogie und antivirale Therapie der FSU Jena für die Testung antiviraler Effekte, Frau C. Franke für die Durchführung der funktionellen Transkriptions-Assays und Herrn Dr. A. Härtl für den HRP-, 3a-HSD und Phagozytostest. Die antimikrobielle Testung wurde von Frau U. Wohlfeld durchgeführt. Frau Dr. U. Möllmann stand mir hilfreich in der Wahl der Testkeime zur Seite. Sie erwies sich als kompetente Diskussionspartnerin und gab mir zahlreiche Denkanstöße in der Bearbeitung und Auswertung der antimikrobiellen Assays. Der Firma Bayer danke ich, dass sie den Metaboliteneinbautest ermöglicht hat.

Im Besonderen danke ich Herrn Dr. F. A. Gollmick für die zahlreichen und zeitaufwendigen NMR-Messungen und seine hilfreichen Diskussionen zur Spektrenauswertung und Strukturaufklärung. Mein Dank gilt Frau A. Perner und Frau R. Koch für die Messung aller MS-Spektren und Frau D. Trübner für die Durchführung der Drehwertbestimmungen.

Zhongli Xu leistete einen großen Beitrag durch die unterstützenden Arbeiten in der Lokalisation der Polyketidsynthase. Nelly Traitcheva hat mich mit viel Energie mit den Arbeitstechniken der Molekularbiologie vertraut gemacht.

Frau Dr. Schlegel danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft in der Lösung verschiedenster Probleme und ihre seelische Aufbauhilfe.

Viele Kollegen und Kolleginnen am HKI haben zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre als fruchtbare Basis dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke ganz besonders meiner Familie, die mir Verständnis entgegen gebracht hat und mich motivierend unterstützt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kerstin Herold
Geburtsdatum	14.05.1974
Familienstand	ledig

3.6.4 Schulausbildung

1980 – 1990	Polytechnische Oberschule “Werner Seelenbinder“, Jena (Mittlere Reife)
1990 – 1992	Anger-Gymnasium, Jena (Allgemeine Hochschulreife)

3.6.5 Akademische Ausbildung

1992 - 1997	Studium der Pharmazie an der „Friedrich-Schiller-Universität“ in Jena Staatsexamen: Prädikat „Gut“ Approbation als Apothekerin
11.07.1997	Erhalt des „Diploms“ an der „Martin-Luther-Universität“, Halle Thema: <i>„Entwicklung, Untersuchung und Optimierung einer bukkalen, bioadhäsiven Progesteron-Zweischichttablette“</i>

Berufliche Qualifikation:

1998 - 2000	Anstellung als Apothekerin in der Rathaus-Apotheke in Schwabach
2001 - 2004	Doktorandin am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V. Jena; Promotion bei Prof. Dr. U. Gräfe Thema: <i>„Untersuchungen zur Struktur, Wirkungsweise und Biosynthese der Cervimycine als Verbindungen einer beson- deren Klasse aromatischer Polyketide aus Streptomyceten“</i>

Jena, den 16.10.2004

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit entstand am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V. Jena zwischen Januar 2001 und März 2004 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Udo Gräfe und Herrn Doz. Dr. Bernd Liebermann.

Ich erkläre,

- dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe,
- dass diese Arbeit weder identisch noch teildentisch mit einer Arbeit ist, welche an der Friedrich-Schiller-Universität Jena oder einer anderen Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades oder als Prüfungsleistung vorgelegt worden ist,
- dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist und
- dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde.

Kerstin Herold

Jena, im Oktober 2004